

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN *LISTERIA MONOCYTOGENES*' E
ÖZGÜ FAJ İZOLASYONU ve GENOTİPİK
KARAKTERİZASYONU**

(DOKTORA TEZİ)

Arş. Gör. Neslihan MUTLU

Danışman

Prof. Dr. Mitat ŞAHİN

MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

2015-KARS

T.C.
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ÇEVRESEL ÖRNEKLERDEN *LISTERIA MONOCYTOGENES*' E
ÖZGÜ FAJ İZOLASYONU ve GENOTİPİK
KARAKTERİZASYONU**

Neslihan MUTLU
Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ

Danışman
Prof. Dr. Mitat ŞAHİN

**Bu çalışma KAÜ Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu tarafından
desteklenmiştir. Proje No: 2013-VF80**

2015-KARS

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Araştırma Görevlisi Neslihan MUTLU tarafından hazırlanmış olan **Çevresel Örneklerden *Listeria monocytogenes*'e Özgü Faj İzolasyonu ve Genetik Karakterizasyonu** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/01/2015

Adı ve Soyadı

İmza

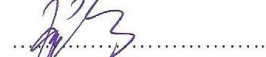
Başkan : Prof. Dr. Mitat ŞAHİN

.....


Üye : Prof. Dr. Salih OTLU

.....


Üye : Prof. Dr. Ziya İLHAN

.....


Üye : Doç. Dr. Yakup YILDIRIM

.....


Üye : Yrd. Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ

.....


Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../.....
gün ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....
Prof.Dr. Ali Rıza AKSOY
Enstitü Müdürü

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KAFKAS ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde Araştırma Görevlisi Neslihan MUTLU tarafından hazırlanmış olan **Çevresel Örneklerden *Listeria monocytogenes*'e Özgü Faj İzolasyonu ve Genetik Karakterizasyonu** adlı bu çalışma, yapılan tez savunması sonucunda jüri üyeleri tarafından Lisansüstü Eğitim Yönetmeliği uyarınca değerlendirilerek oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 15/01/2015

Adı ve Soyadı

İmza


Başkan : Prof. Dr. Mitat ŞAHİN

.....

Üye : Prof. Dr. Salih OTLU

.....

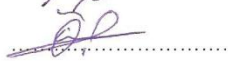
Üye : Prof. Dr. Ziya İLHAN

.....

Üye : Doç. Dr. Yakup YILDIRIM

.....

Üye : Yrd. Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ

.....

Bu tezin kabulü, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulunun/...../.....
gün ve/..... sayılı kararı ile onaylanmıştır.

.....
Prof.Dr. Ali Rıza AKSOY
Enstitü Müdürü

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
KISALTMALAR	i
TABLO LİSTESİ	ii
1. GİRİŞ VE GENEL BİLGİLER	1
1.1. Listeria' ların Genel Özellikleri.....	1
1.1.1 Listeria monocytogenes.....	2
1.1.2 Tarihçe.....	2
1.1.3 Etiyoloji	3
1.1.4 Epidemiyoloji	6
1.1.5 Patogenez	7
1.1.6 Virülens Faktörleri.....	8
1.1.7 İmmun Yanıt	14
1.1.8 Klinik Belirtiler	16
1.1.9 Teşhis.....	19
1.1.10. Sağaltım	19
1.1.11. Koruma	19
1.2. Bakteriyofajlar	20
1.2.2. Yapısal Özellikleri ve Çoğalmaları	22
1.2.2.1. Yapısal Özellikleri	22
1.2.2.2. Çoğalmaları.....	24
1.2.3. Antimikrobiyal Ajan Olarak Bakteriyofajlar (Faj Terapisi)	26
1.2.4. Bakteriyofajların Günümüzdeki Kullanımları	30
1.2.5. Listeria monocytogenes'e Özgü Fajlar	33
1.3. Amaç.....	37
2. MATERYAL-METOT	38
2.1. MATERYAL.....	38
2.1.2. Bakteriyofaj İzolasyonu İçin Örnekler	38
2.1.3. Standart Bakteri Suşları.....	39
2.1.4. Konakçı Duyarlılık Testi ve Listeria Türlerinin İzolasyonu İçin Kullanılan Araç ve Gereçler	39

2.1.5. İzole Edilen Fajların PCR Temelli Moleküler Tanısı İçin Kullanılan Araç ve Gereçler.....	41
2.2. METOT	42
2.2.2. Örneklerden Faj İzolasyonu.....	42
2.2.3. Mitomisin-C ile Faj İzolasyonu	42
2.2.4. İzole Edilen Bakteriyofajların Titrasyonu.....	43
2.2.5. Konakçı duyarlılığı testi	43
2.2.6. Bakteriyofajlardan DNA İzolasyonu	43
3. BULGULAR	46
3.1. İzolasyon Bulguları	46
3.2. Genotipik Karakterizasyon Bulguları	49
3.2.2. RAPD-PCR Bulguları.....	49
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	53
5. ÖZET.....	58
6. SUMMARY.....	59
7. KAYNAKLAR.....	60
8. ÖZGEÇMİŞ	71

KISALTMALAR

Kısaltma	Açıklama
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion Agar
Bp	Base Pair
CAMP	Christie-Atkins-Munch-Petersen
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FDA	Food and Drug Administration
FTS	Fizyolojik Tuzlu Su
ISO	Uluslararası Standartlar Organizasyonu
Kb	Kilobase
LLO	Listeriolysin O
LSA	Listeria Selective Agar
PCR	Polymerase Chain Reaction
prfA	Positive Regulatory Factor A
TBE	Tris-Borik Asit-EDTA
USDA	United States Department of Agriculture

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1	Listeria türlerinin ayırt edici özellikleri	1
Tablo 2	Listeria cinsinin serovarları	6
Tablo 3	Ackermann Klasifikasyonu	24
Tablo 4	Sovyet Rusya ve Polonya'da yapılan başlıca faj tedavisi çalışmaları	28
Tablo 5	Antibiyotik ve bakteriyofajların profilatik ve/veya teröpatik olarak kullanılmalarının karşılaştırılması	30
Tablo 6	Bazı ticari şirketlerin lisanslı ticari bakteriyofaj preparatları	32
Tablo 7	Günümüze kadar tanımlanan Listeria spesifik fajların özeti	36
Tablo 8	Bakteriyofaj açısından değerlendirilen örneklerin toplandıkları yerler	38
Tablo 9	Bakteriyofaj izole edilen örnekler	46

RESİM LİSTESİ

<u>Resim No</u>	<u>Adı</u>	<u>Sayfa No</u>
Resim 1	Listeria monocytogenes identifikasyonunda CAMP Testi	5
Resim 2	Listeria türlerinin memeli hücrelerine giriş yolları	10
Resim 3	Listeria monocytogenes'in hücreler arası geçişi	14
Resim 4	T4 fajının morfolojik yapısı	22
Resim 5	Fajların Bradley sınıflandırmasına göre morfolojik özellikleri	23
Resim 6	Fajların litik ve lizojenik hayat döngüleri	26
Resim 7	Bakteriyofaj plak görünüşleri	48
Resim 8	OPL5 ve P1 primeri kullanılarak elde edilen PCR'in agaroz jel görüntüsü	50
Resim 9	P2 ve P1 primerleri kullanılarak elde edilen PCR'in agaroz jel görüntüsü	51
Resim 10	RAPD5 primeri kullanılarak elde edilen PCR'in agaroz jel görüntüsü	52

ÖNSÖZ

Listeriozis ruminantlarda abortus, ensefalomyelitis ve sepsisemi ile seyrederek, ekonomik kayıplara yol açan zoonoz bir enfeksiyondur. *Listeria*'lar 1-45°C gibi çok geniş ısı aralığında üreyebilirler. Tuza ve pH'ya toleransları çok fazladır. Bu etkenlerin doğal rezervuarlarının toprak ve memelilerin sindirim sistemi olması, *Listeria*'lar ile gıdaların kontaminasyon ihtimalini artırmaktadır. Ayrıca buzdolabı ısısında üreyebilmeleri halk sağlığı açısından önem arz etmektedir.

Teknolojinin gelişimiyle birlikte daha hızlı bir yaşam tarzının geliştiği toplumlarda hazır gıda tüketiminin artması, buzdolabı ısısında üreyebilen *Listeria*'lara karşı daha dikkatli ve kontrollü tüketimi gerektirmektedir. Listerial enfeksiyonlar, çoğunlukla gıda kaynaklı olması nedeniyle salgınlar şeklinde seyredebilir. İnfekte hayvanlar dışkı, süt, idrar, atık fetus ve uterus akıntıları ile çevreyi ve gıda ürünlerini kontamine ederler. İnfeksiyonlarla mücadelenin en kolay ve ekonomik yolu koruma ve kontrol yöntemidir. Gıdaların etkenlerle bulaşması önlenmeli, bunun içinde gıda üretimindeki personelin eğitimi titizlikle yapılmalı ve kontroller aksatılmamalıdır.

Bakterileri infekte eden viruslar (bakteriyofajlar), keşiflerinin ardından anti-bakteriyel etken olarak denenmişler fakat antibiyotiklerin keşfinden sonra fajlarla ilgili çalışmalar pratik olmadıkları gerekçesiyle devam ettirilmemiştir. Bakteri suşlarında doğal seleksiyon yoluyla antibiyotik direncinin oluşması, bazı araştırmacıları faj tedavisini antibiyotik tedavisine bir alternatif olarak tekrar değerlendirmeye sevk etmiştir. Antibiyotiklerden farklı olarak fajlar, milyonlarca yıldır süregeldiği gibi, bakterilerle beraber evrimleştikleri için, sürekli bir direncin oluşma olasılığı yok sayılabilir. Ayrıca, etkili bir faj, özgül bakterisini tamamen lize olana kadar enfekte etmeye devam edecektir. Belli bir faj genelde ancak belli bir bakteri tipini enfekte edebilir ki bu birkaç bakteri türü olabileceği gibi bir türün sadece bazı alt türleri de olabilir. Faj terapisinin bir diğer avantajı da başka bakterilere zarar gelmeyeceğinden dar spektrumlu antibiyotik tedavisine benzeridir. Hedef bakteriyi etkisiz hale getirmesi ve insan, hayvan ve gıdalarda herhangi bir zararlı etkisinin olmamasıdır.

Bu çalışmanın, halk sağlığı açısından önemi bir zoonoz olan listeriozisin önlenmesinde katkı sağlayacağı dşnlmektedir.

Tez alışması süresince yakın ilgi ve desteklerini gördüğüm danışman hocam Prof. Dr. Mitat şAHİN'e, çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen hocalarım Prof. Dr. Salih OTLU' ya, Yrd. Doç. Dr. Özgür ÇELEBİ' ye, Yrd. Doç. Dr. Fatih BÜYÜK' e, Yrd. Doç. Dr. Aliye GÜLMEZ SAĞLAM'a ve Arş. Gör. Elif ÇELİK'e, maddi destekte bulunan Kafkas Üniversitesi Bilimsel ve Teknolojik Araştırmalar Fonu Yönetim Kurulu'na, yasal prosedürlerde yardımcı olan Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü personeline ve her zaman maddi ve manevi desteklerini gördüğüm anneme, babama ve eşime teşekkür ederim.

1. GİRİŞ ve GENEL BİLGİLER

1.1. *Listeria*' ların Genel Özellikleri

Listeria spp. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology' de düzgün spor oluşturmayan, Gram pozitif çomaklar seksiyonunda olup *Listeria* cinsi mikroorganizmalar; Bacilli sınıfında, Bacillales takımında, Listeriaceae familyasında bulunurlar (Garrity ve ark. 2001). *Listeria*'ların bulunduğu seksiyonda ayrıca *Lactobacillus*, *Erysipelothrix*, *Brochotrix*, *Renibacterium*, *Kurthia* ve *Caryophanon* cinsleri de bulunmaktadır (Arda ve ark. 1999).

Listeria'ların 3'ü patojen 6 türü tanımlanmıştır. Bunlar; *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii* ve *L. grayi*'dir. *L. monocytogenes* en önemli patojendir. Diğer iki patojen olan *L. ivanovii* ve *L. innocua* hayvan hastalıklarından daha az sorumlu tutulmaktadır (Arda ve ark. 2000).

Listeria'lar ismini, İngiliz cerrah ve bakteriyolog Joseph Lister'dan almaktadır. Çomak şeklinde, flagellumları sayesinde hareketli, Gram pozitif bakterilerdir. Glukoz ve bazı karbonhidratlardan asit üretirler. Eskulini hidrolize ederler. Katalaz pozitif ve aerobiktirler (Breed ve ark. 1957). *Listeria* türlerinin bazı ayırıcı özellikleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. *Listeria* türlerinin ayırt edici özellikleri

<i>Listeria</i> Türleri	Kanlı Ağarda Hemoliz	CAMP Testi		Şekerlerden Asit Üretimi		
		<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>	D-mannitol	L-ramnoz	D-ksiloz
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	-	+	-
<i>L. ivanovii</i>	++	-	+	-	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-	-	-	V	-
<i>L. seeligeri</i>	+	+	-	-	-	+
<i>L. welshimeri</i>	-	-	-	-	V	+
<i>L. grayi</i>	-	-	-	+	V	-

V: değişken reaksiyon (Quinn ve ark. 2004).

1.1.1 *Listeria monocytogenes*

Gray ve Killinger (Gray ve Killinger 1966) 1966 yılında, *Listeria monocytogenes*'in ilgili olarak hayvan ve insanlarda neden olduğu listerik infeksiyonlar hakkında bir derleme yayınlamışlardır. Bu tarihten itibaren, *Listeria monocytogenes* Kuzey Amerika'da ve Avrupa'da gıda kaynaklı listeriozisten sorumlu tutulmuştur ve patojenite mekanizmaları hızlı bir şekilde araştırılmaya başlanmıştır (Cossart ve Mengaud 1989).

1.1.2. Tarihçe

L. monocytogenes'e ilk olarak 1891 yılında Alman hastalardan alınan örneklerde rastlanmıştır. Daha sonra 1911'de İsveç'te tavşan karaciğerinden izole edilmiş ve neden olduğu hastalığa ise 1925 yılında Almanya'da koyunlarda rastlanılmıştır (Yavuz ve Korukluoğlu 2010)

L. monocytogenes ilk kez Murray ve arkadaşları tarafından tanımlanmış (Murray ve ark. 1926), deney hayvanlarında monositoz oluşturduğu için *Bacterium monocytogenes* olarak isimlendirilmiştir (Farber ve Peterkin 1991). Pirie tarafından 1927'de *Listerella hepatolytica* olarak tekrar isimlendirilmiş ve yine Pirie tarafından 1940 yılında bugünkü ismi verilmiştir. İlk olarak tanımlanmasından sonra, canlılardan doğrulanmış ilk izolasyon 1929 yılında Gill tarafından koyundan, Nyfeldt tarafından ise insanlardan yapılmıştır (Gray ve Killinger 1966). Bu tarihlerden sonra, infekte hayvanlarla temas halinde bulunan insanlarda sporadik listeriosis vakaları bildirilmiştir (Cain ve Mccann 1986). *L. monocytogenes*'e olan ilgi, 1980'lerde gıda kaynaklı salgınların sonucu olarak oldukça artmış ve yayımlanan makale sayısında da buna paralel olarak hızlı bir artış olmuştur (Farber ve Peterkin 1991).

L. monocytogenes, cins içindeki tek tür iken, daha sonra *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. welshimeri* ve *L. seeligeri* ayrı ayrı tanımlanmışlardır (Seeliger ve Jones 1986, McLauchlin 1987). Fenotipik ve genotipik karakterleri temel alınarak yapılan çalışmalarda, *L. murrayi* ve *L.*

grayi'nin cinse dahil edilib edilemeyeceği tartışmalı olmuştur (Stuart ve Welshimer 1974, Wilkinson ve Jones 1977, Rocourt ve ark. 1987) fakat son bulgular (Rocourt ve ark. 1992) bunların aslında aynı tür olduğunu göstermiştir ve tür, *L. grayi* olarak adlandırılmıştır. *L. denitrificans* olarak izolasyonu yapılan bir tür de daha sonra *Josenia* genusuna dahil edilmiştir (Rocourt ve ark. 1987).

Ülkemizde *Listeria* üzerine yapılan bazı önemli çalışmalar 1945 yılında Özcebe ve Doğuer, 1952 yılında İyigören, 2005 yılında Kocabıyık ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (Akça ve Şahin 2011).

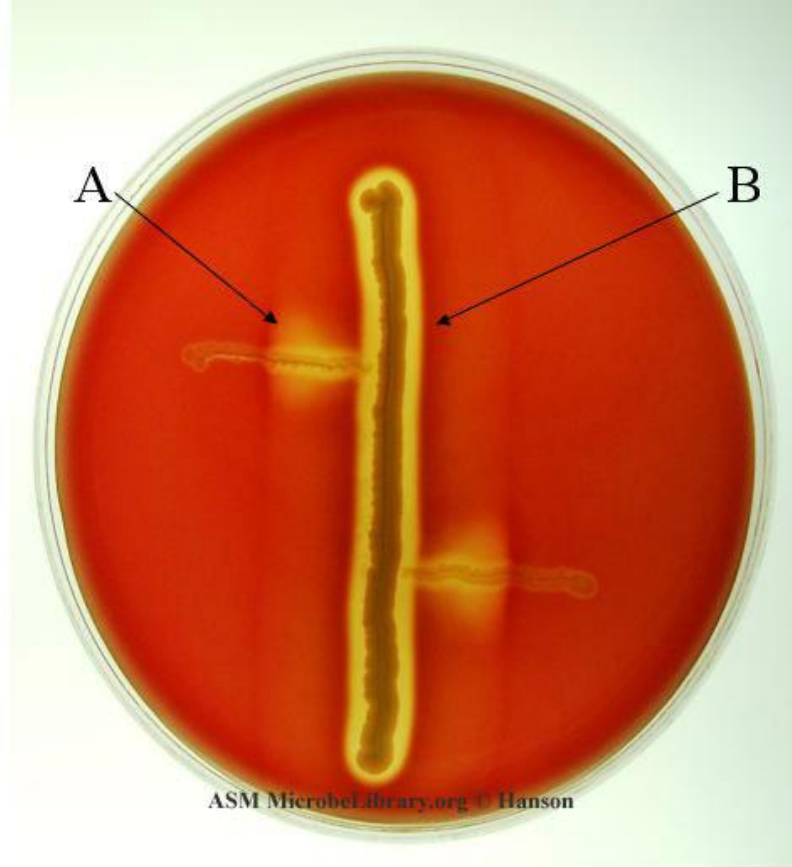
Kars Yöresi'nde 2004 yılı Mart ayında, 5 adet atık koyun fötuslarına ait karaciğer ve akciğerlerden yapılan bakteriyolojik kültürlerde *L. ivanovii* identifiye edildiği bildirilmiştir (Şahin ve Beytut 2006). 2010 yılında yapılan bir çalışmada ise atık yapan 96 inekten 2 tanesinin sütünde *L. monocytogenes*, 250 vajinal sıvı örneğinden 14'ün de *Listeria* spp. izole edilmiştir (Akça ve Şahin 2011).

1.1.3. Etiyoloji

L. monocytogenes, Gram-pozitif, çomak şeklinde, 1-2 µm uzunluğunda ve 0,5 µm genişliğinde kapsülsüz organizmalardır. 3-45 °C'de arasında üreyebilirlerse de optimum üreme ısıları 30-37 °C'dir. Organizma, 9.6 gibi yüksek pH değerlerinde, aerobik ve mikroaerobik ortamda hızla üreyebilirken, 5.6'dan daha düşük pH değerleri üremeyi inhibe etmektedir. Kolonileri küçük, düzgün, hafifçe basık ve ışık altında beyazdır (Low ve Donachie 1997). Sıvı besiyerinde ve kanlı agarda kolay ürer ve dar bir beta hemoliz alanı oluşturur. Klinik örneklerde mikroorganizma Gram özelliği bakımından değişken ve kok veya diplokok şeklinde görülebilir. Mikroorganizma düşük ısıyı, yüksek pH derecelerini ve yüksek tuz oranlarını tolere edebildiği için toprak, su, lağım, hayvan yemleri ve buzdolabındaki gıdalarda canlı kalabilmektedir (Klara ve ark. 2009) Mikroorganizma 37°C'de ya çok az hareketlidir ya da hareketsizdir (Gray ve Killinger 1966, Seeliger ve Hohne, 1979, Seeliger ve Jones, 1986). Genellikle 22-26°C de belirgin aktif hareket vardır (Arda ve ark.,1997). *L. monocytogenes* pastörizasyon ısısında

(62°C'de 30 dakikada; 71.6°C'de 15-30 saniyede) yıkımlanır. Kuruluğa oldukça dirençlidir. Gıdalarda, saman, toprak ve talaşta aylarca canlı kalabilir. Yaygın olarak kullanılan dezenfektanlara duyarlıdır (Arda 2000).

Listeria türleri katalaz, Voges-Proskauer (VP) ve eskulin pozitifdir. İndol ve oksidaz negatiftirler. Üreyi hidrolize edemezler, nitratları indirgeyemezler ve jelatini sıvılaştıramazlar (Low ve Donachie 1997). *Listeria* türlerinden yalnızca *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* ve *L. seeligeri* hemolitikdir. *Listeria*'ların hemolitik özelliklerini değerlendirmek için genellikle CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) testi kullanılmaktadır. α-hemolizin üreten *Staphylococcus aureus* ve *Rhodococcus equi* koyun kanı içeren agara aynı yönde ekilir ve *Listeria* spp. test kültürleri *S. aureus* ve *R. equi* ekim alanlarına temas etmeyecek şekilde karşısına dikey olarak ekilir. *R. equi*, *L. ivanovii*'nin oluşturduğu hemoliz zonunu belirgin olarak artırırken, *S. aureus* ise *L. monocytogenes*'in hemoliz zonunu genişletir (Hearty 2005). *S. aureus* sifingomiyelin-fosfohidrolaz enzimi ile eritrositlerin membranında bulunan sifingomyelinleri çözer fakat eritrositleri lize edemez. Beta hemolitik olan *L. monocytogenes* ve *L. seeligeri* hemolizinleri ile eritrositleri daha kolay parçalarlar. *L. ivanovii* ise benzer yardımı *R. equi*'den alır (Şekil 1) (Akça 2010).



Resim 1. *Listeria monocytogenes* identifikasyonunda CAMP Testi (A) *Listeria monocytogenes*, (B) *Staphylococcus aureus*. (<http://www.microbelibrary.org>, Erişim: 13.7.2012)

Serotiplendirme hücre yüzeyinde bulunan antijenik determinantların belirlenmesiyle yapılmaktadır. *Listeria*'ların somatik O antijeni ve flagellar H antijenleri 1940 yılında Paterson tarafından belirlenmiş ve 4 serolojik tip belirlemiştir (Seeliger ve Hohne 1979). Daha sonra bu serotiplere yeni antijenik varyantlar eklenerek genişletilmiştir (Seeliger 1961, Seeliger ve Hohne 1979) ve günümüzde 16 serotip içeren Seeliger/Donker-Voet tablosu kabul edilmiştir (Tablo 2) (Low 1997).

Tablo 2. *Listeria* cinsinin serovarları

Paretson	Seeliger-Donker-Voet	O antijenleri	H Antijenleri
1	1/2a	I II (III) ^a	A B
	1/2b	I II (III)	A B C
2	1/2c	I II (III)	B D
3	3a	II (III) IV	A B
	3b	II (III) IV (XII XIII)	A B C
	3c	II (III) IV (XII XIII)	B D
4	4a	(III) (V) VII IX	A B C
	4ab	(III) V VI VII IX X	A B C
	4b	(III) V VI	A B C
	4c	(III) V VII	A B C
	4d	(III) (V) VI VIII	A B C
	4e	(III) V VI (VII IX)	A B C
	5	(III) (V) VI (VIII) X	A B C
	7	(III) XII XIII	A B C
	6a(4f)	(III) V (VI VII) (IX) XV	A B C
	6b(4g)	(III) (V VI VII) IX X XI	A B C

()^a; değişken (Seeliger ve Jones'a göre) (Low J. L. 97).

1.1.4. Epidemiyoloji

Listeria türleri çevrede, özellikle de toprak, su, lağım, bitkiler (çim, çayır, orman, silaj vb.), hayvan dışkıları, çiftlikler ve gıda üretim tesislerinde yaygın olarak bulunur (Sauders ve Wiedmann 2007). *Listeria* türleri dünyada yaygın olmasına karşılık, insanlarda neden oldukları hastalıklara sıklıkla gelişmiş ülkelerde rastlanmaktadır. *Listeria* spp. evcil hayvanlar, çiftlik

hayvanları, diğerk memeli hayvanlar, rodentler, amfibiler, balıklar, artropodlar ve 17'den fazla kanatlı türünü etkilediğı için önemli bir zoonoz sebebidir (Klara ve ark. 2009). 50'den fazla hayvan türünden izole edilmiştir ve bazı bölgelerde insanların %70'inin asemptomatik fekal taşıyıcı olduğı bildirilmiştir (Arda ve ark. 1997).

Toprak kontaminasyonu ve kontamine gıdaların sindirilmesi *Listeria*'ların başlıca bulaşma yoludur. İnfeksiyondan pH 5.5'ten yüksek olan kötü kaliteli silaj sıklıkla sorumlu tutulmaktadır ve bu nedenle listeriozise "silaj hastalığı" da denmektedir (Arda ve ark. 1997).

Listeriozis, besinlerle ilişkili olduğunun anlaşıldığı 1981 yılına kadar, insanlarda nadiren ortaya çıkan bir hayvan hastalığı olarak kabul edilmiştir. Sonrasında ortaya çıkan salgınlar, *L. monocytogenes*'i önemli bir gıda kaynaklı patojen haline getirmiştir (Warriner ve Namvar 2009). *L. monocytogenes* et, süt ve süt ürünleri, sebzeler, kümes hayvanları ve balık gibi çeşitli gıdalardan izole edilmiştir (Parihar ve ark. 2008).

Mikroorganizmanın orijininin toprak olduğı kabul edilmekle birlikte listeriozis toprak kaynaklı hastalıklar kategorisinde değil, gıda kaynaklı hastalıklar kategorisindedir. Gıda kaynaklı listeriozisin, çevresel kontaminasyon, çevreden hayvanlara ve gıdaların temas ettiğı yüzeylere kontaminasyon sonucu ortaya çıktığı bilinmektedir. Hatta gıdaların etkenle üretimleri sırasında kontamine olduktan sonra insanlara bulaştığı da düşünülmektedir (Kozak ve ark. 1996).

1.1.5. Patogenez

Listeria monocytogenes, humoral bağışıklık mekanizmalarına maruz kalmadan, hem fagositik hem de non-fagositik hücreleri invaze etme, intrasellüler olarak canlı kalma, replike olma ve hücreden hücreye taşınma yeteneklerine sahiptir (Arda ve ark. 1997).

Etken vücuda genellikle sindirim sisteminden girerek hastalık oluşturmaktadır. Sağlıklı memeliler üzerinde yapılan denemelerde, klinik

infeksiyon oluşturmak için; gerekli oral inokulum miktarının $\geq 10^9$ mikroorganizma olduğunu göstermiştir. Hastalığın çıkış ve bulaşmasında bir çok predispoze edici ve hayvanların direncini kıran faktörlerin rolü vardır. Gebelik, gıda değişikliği, viral ve paraziter infeksiyonlar, iyi ve dengeli beslenmeme, immunsupresyon, etkenin hastalık yapma yeteneğini arttırmaktadır. Araştırmalar invaziv hastalığın inkübasyon periyodununun 11 ila 70 gün arasında (ortalama 31 gün) olduğunu göstermiştir (Arda ve ark. 1997, Lorber 1997). Ayrıca inhalasyon ve konjuktival yolla da infeksiyon oluşabilmektedir. *L. monocytogenes*, çabuk yayılan ve epidemiler oluşturan bir mikroorganizma olmayıp, sporadik olgular halinde ortaya çıkan infeksiyonlara neden olmaktadır (Arda ve ark.1997).

1.1.6. Virülens Faktörleri

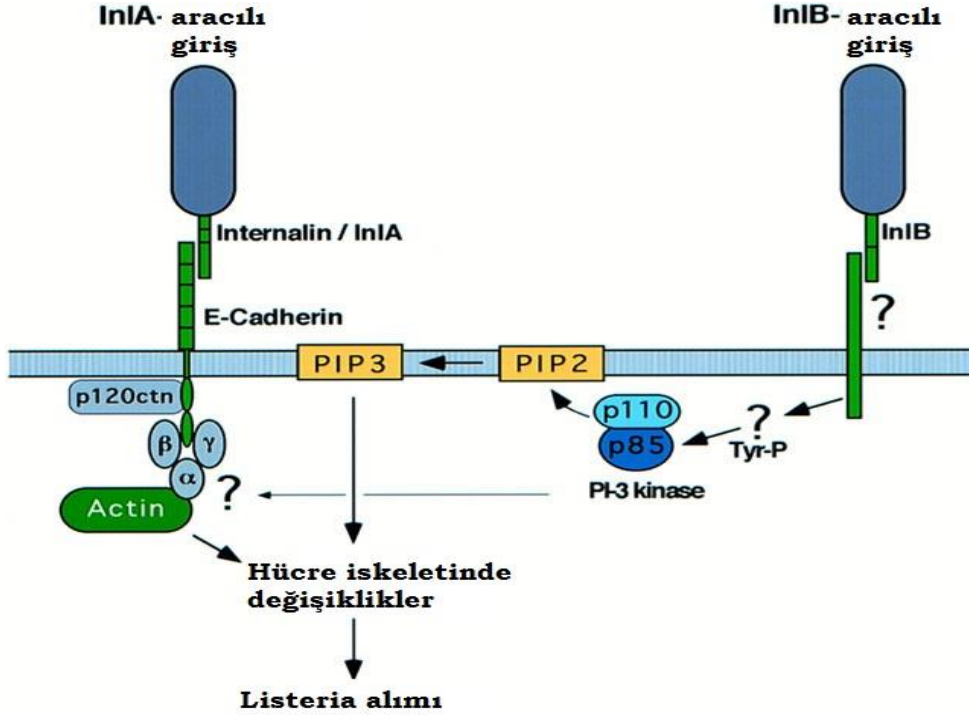
L. monocytogenes sindirim sistemi ile alındıktan sonra intestinal mukozaya tutunur. Bu yüzden ilk bakışta flagellaya bağlı hareket önemli bir virülens faktörü gibi görünse de etkenin vücut ısısında flagella oluşumu kısıtlandığı için bu durumun virülenste önemli olduğu söylenemez. Çünkü, *L. monocytogenes*'in peritrik flagella oluşumu düşük ısıda (20-25°C) gerçekleşmektedir (Salyers ve Whitt 2002). Virülens açısından daha önemli olan hareket, bakterinin konak hücre aktinini kullanarak hücre içinde ve hücreler arasında yaptığı hareket yeteneğidir (Kathariou 2002). Aynı tip hareket *Shigella* spp.'nin oluşturduğu vakalarda da tanımlanmıştır. Bakterinin hücre içi ve hücreler arası bu yeteneği, fotoreaktif bir bileşiğin, gelişen aktin uzantılarına bağlanması ve bu durumun lazer ışığında tespiti ile belirlenmiştir. Yani bakteriyi sitoplazma boyunca iten, ilerlemesini sağlayan, bakterinin sonunda gelişen aktin polimerizasyonu sonucu oluşan uzantıların gelişmesidir (Salyers ve Whitt 2002).

L. monocytogenes'in barsak mukozal bariyerini geçebilmesinin nedeni endotelial hücreler tarafından organizmanın aktif endositozudur. Kan dolaşımına giren mikroorganizma hematojen yol ile yayılır. *L. monocytogenes*'in sentral nervöz sistem (CNS) ve plasentaya özel bir affinitesi vardır (Drevets ve ark. 2004, Lorber 1997, Vazquez-Boland ve ark.

2001). Bakterinin yüzeyinde bulunan α -D-galactose yapılarıyla, memeli intestinal hücrelerindeki α -D-galactose reseptörlerine bağlandığı bilinmektedir. Bu durum çoğu bakteriyel tutunmanın tersi bir durum olarak görünür. Çünkü normalde bakterideki bir protein konak hücrenin karbonhidrat parçasına bağlanmaktadır (Salyers ve Whitt 2002).

Bakteri tutunması fagositozu uyarırken, bakteri membranında bulunan ve internalin olarak adlandırılan 80-kDa'luk membran protein invazyon ile ilgilidir (Salyers ve Whitt 2002). Internalin bakterinin fagosite edilebilir kılınmasını, epitelyum hücreler ve hepatositlerden içeri girmesini sağlayan bakteriyel hücre yüzey proteinlerindedir (Southwick ve Purich 1996). İnvazyonda rol alan genler, internalin A (in1A) ve internalin B (in1B)'dir. In1A'nın reseptörü E-cadherin'dir (Cossart ve Lecuit 1998, Edelson ve Unanue 2000, Cossart ve ark 2003, Orndorf ve ark. 2006). E-cadherin hücreler arası iletişimi sağlayan bir transmembran glikoproteinidir. In1A intestinal epitel hücre katındaki Caco-2 hücrelerine invazyonda rol alan 800 aminoasitten oluşan bir proteindir. In1B ise 630 aminoasitten oluşan ve hepatositleri içeren geniş bir hücre hattının içine *Listeria*'nın girişi ile ilgilidir (Dramsı ve ark. 1996, Stebbins 2004, Orndorf ve ark. 2006).

Listeria konak hücrelerine giriş için en az 2 yol izler. Birincisi in1A-E cadherin yolu, diğeri ise in1B bağımlı yoldur (Cossart ve Lecuit 1998, Cossart ve ark. 2003).



Resim 2. *Listeria*'ların memeli hücrelerine giriş yolları (Cossart ve Lecuit 1998).

Hücre içerisine fagozom içinde giren *L. monocytogenes* ürettiği 60 kDa'luk ekstrasellüler bir protein olan listeriolizin-O (LLO) sayesinde bu vezikülü parçalayarak vezikülden çıkar ve hücre sitoplazmasında çoğalır (Portnoy 1992, Bielecki 1997, Glomski ve ark. 2002, Portnoy ve ark. 2002). LLO, aynı zamanda *L. monocytogenes*'in kanlı agarda ürettiğinde β -hemoliz zonu oluşumuna neden olmaktadır (Arda ve ark. 1997). LLO, diğer iki Gram pozitif patojen olan *Streptococcus pyogenes* (streptolysin O) ve *S. pneumoniae* (pneumolysin) tarafından üretilen hemolizin sitokinlerine amino asit sekansları yönünden benzemektedir (Bhunja 1997, Glomski ve ark. 2002). LLO üretimini kontrol eden *hly* genidir (Bielecki 1997, Goebel ve Kuhn 2000, Portnoy ve ark. 2002, Portnoy 1992). LLO *L. monocytogenes*'in en önemli virülens faktörüdür (Chakraborty ve Goebel 1988, Goebel ve Kuhn 2000, Portnoy ve ark. 2002, Shaughnessy ve Swanson 2007). *L. monocytogenes*'in makrofajlar içerisinde yaşamını sürdürmesi için fagozomal füzyon oluşmadan önce fagozomdan kaçması gerekmektedir (Salyers ve Whitt 2002). Bu nedenle *L. monocytogenes*'in vakuolden kaçışında fagositozdan sonra oluşan endozom/fagozom olgunlaşması ve asidite (pH

5.9) son derece önemlidir (Bhunja 1997, Portnoy ve ark. 2002, Cotter ve Hill 2003). Fagozomal membran içinde LLO'nun iki fonksiyonu vardır. Birincisi; pH uyarımı ile fagozomun olgunlaşmasını durdurması, diğeri ise vakuolden proteinlerin geçmesi için bir kanal açılmasındaki rolüdür (Portnoy ve ark. 2002). *L. monocytogenes* ayrıca katalaz ve süperoksit dismutaz üretmektedir. Bu iki enzim fagolizozom içindeki oksidatif reaksiyonlardan korumaya yardımcı olmaktadır. Fakat bu enzimlerin virülens için önemi tam olarak bilinmemektedir. Fagositozik vesikülden kaçış için LLO'nun önemi deneysel olarak da gösterilmiştir (Salyers ve Whitt 2002).

L. monocytogenes LLO'dan başka en az iki hemolizin daha üretmektedir. Bunlar; fosfatidilinositol-spesifik fosfolipaz C (PI-PLC) ve fosfatidilkolin-spesifik fosfolipaz C (PC-PLC)'dir (Goebel ve Kuhn 2000, Salyers ve Whitt 2002). Membranda oluşturduğu por formu ve konak hücrelerini lize eden LLO'nun aksine fosfolipazlar, konak hücre membran lipidlerini PI ve PC ile hidrolize ederek bozarlar. PI-PLC (*plcA*) bir virülens faktörü olarak rapor edilmiştir. Çünkü *plcA*'daki bozulma ile oluşan mutant suşlar farelerde infeksiyon oluşturamamışlardır. PI-PLC *Listeria*'nın intrasellüler yayılımında oldukça etkilidir (Salyers ve Whitt 2002). Ayrıca oluşan mutasyonun etkileri birçok genin aktivasyonunda düzenleyici olan *prfA* geni üzerinde polar bir etkiye neden olmaktadır. *PrfA*; *hly* ve *mp1/actA/plcB*'yi içeren bir çok geni aktive eden düzenleyici bir proteindir. Bu genlerin ekspresyonunun kaybının virülens için negatif etkili olacağı düşünülmektedir (Portnoy ve ark. 1992, Salyers ve Whitt 2002, Vazquez-Boland ve ark. 2001). Fosfatidilkolin-spesifik fosfolipaz C, lesitinaz olarak da isimlendirilmektedir (Vazquez-Boland ve ark. 2001, Salyers ve Whitt 2002). PC-PLC'yi kodlayan gen *plcB*'dir. PC-PLC ayrıca, Gram pozitif bakteri türleri olan *Clostridium perfringens* ve *Bacillus cereus* tarafından üretilen lesitinaz ile benzer aminoasit sekanslarına sahiptir. Ancak *C. perfringens*'in sebep olduğu infeksiyon lezyonlarında meydana gelen doku hasarı tipi listerioziste görülmez. PC-PLC, *L. monocytogenes*'in hücreden hücreye yayılmasına yardımcı olmaktadır (Salyers ve Whitt 2002).

L. monocytogenes konak hücre sitoplazmasında intrasellüler bir patojen için oldukça iyi bir gelişim süresi olan yaklaşık 50 dakikada bir replike olmaktadır. *L. monocytogenes*, *Shigella* spp.'e benzer şekilde hücre sitoplazmasında aktinin polimerize olması sonucu şekillenen uzantılar yardımı ile sağlanan hareketle komşu hücrelere geçmektedir (Southwick ve Purich 1996).

Konak hücrede aktin filamentlerinin birleşmesinin düzenlenmesi, filament-capping ve filament-severing proteinleri, monomer-sequestering proteinler, binding proteinler ve cross-linking proteinleri gibi çok sayıda proteinler ile olmaktadır. Bir konak hücre komponenti olan profilin, *Listeria*'ların aktin temelli hareketinde merkezi rol oynamaktadır. Bu protein aktin monomerlerini bir bir bağlar, aktin monomerlerinin konformasyonunu değiştirir ve ATP'nin aktin bağlı ADP'ye değişimini hızlandırır. Profilin yeni aktin filamentlerinin bağlandığı her yerde yüksek oranda bulunur ve poliprolinleri bağlayan tek aktin düzenleyici proteindir (Southwick ve Purich 1996).

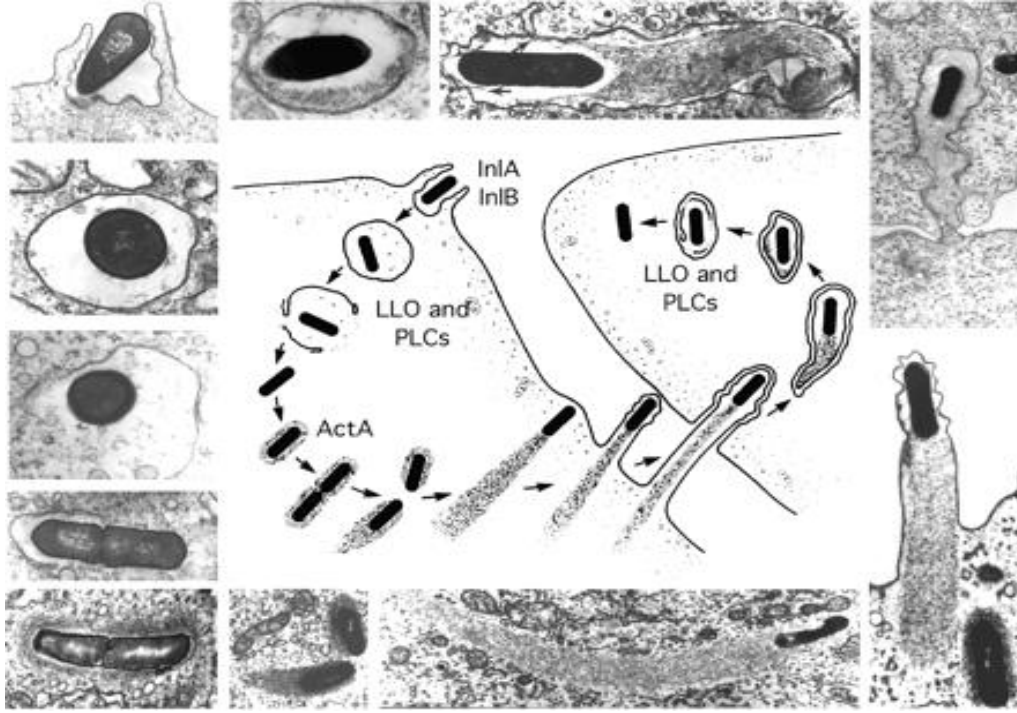
Vasodilatör-sitimulant fosfoprotein (VASP) olan konak hücre proteinleri yeni aktin filamentlerinin bağlandığı yerdeki spesifik bölgelerde profilin konsantrasyonunu sağlamaktadır. VASP monomerleri her birinde bir çok prolin artığı olan dört potansiyel profilin bağlayan bölge bulundurur. Konak hücrelerinde VASP tetramer olarak bulunduğu her bir VASP molekülü 16 profilin molekülü yukarı çekebilir (Southwick ve Purich 1996, Vazquez-Boland ve ark. 2001).

Listeria'ların intrasellüler hareketinde önemli olan üçüncü bir konak hücre proteini alfa-aktin'dir. Bu aktin filament bölgelerini birleştiren ve paketler içinde bağlayan bir hücre iskeleti proteindir. Paketlenmiş aktin filament formları filamentlerin sert bir ağıdır. Bu aktin ağının kısalığı bakteri ve konak hücre arasındaki polimerize olmayan aktin için yapılan yarışmanın sonucudur. Aktin uzantı aslında bakterinin arka yüzeyinde oluşan içi boş bir ağ sistemidir ve bakteri hareketine yardımcı olmaktadır. Zamanla aktin

flamentleri depolimerize olduğu için Şekillenen aktin uzantılar, bakteri daha uzağa gittikçe yavaş yavaş gözden kaybolur (Southwick ve Purich 1996).

Konak hücrede aktin flamentlerinin oluşumunun başlatılmasında bakterinin salgıladığı 90 kDa'luk bir öncü proteinin olduğu düşünölmektedir. Bu proteinin *ActA* geni tarafından kodlandığı (Bhunia 1997, Kathariou 2002, Salyers ve Whitt 2002, Vazquez-Boland ve ark. 2001) ve *prfA*'nın kontrolü altında olduğu bildirilmektedir.

Konak hücre membranına karşı itilen mikroorganizma membranda filopod adı verilen çıkıntılar oluşmasına neden olmaktadır. Bunlar makrofaj, enterosit ve hepatosit gibi komşu hücreler tarafından fagosite edilir. Komşu hücrelerin bakteri yüklü filopodları tanıma ve sindirmesinin tam mekanizmasının bilinememektedir (Portnoy 1992, Southwick ve Purich 1996, Lorber 1997). Bakteriyel oligoprolin içeren yüzey proteini *ActA*, aktin flamentlerinin birleşmesinin uyarılması ve hücreden hücreye yayılma için gereklidir (Vazquez-Boland ve ark. 2001). Bu yüzden bu protein önemli bir virölens faktördür. Bu tarz gelişen yaşam siklusu aracılığıyla (Resim 3) *L. monocytogenes*, antikorlar, komplement ve nötrofiller gibi savunma faktörlerinden etkilenmeden hücreden hücreye geçerek infeksiyonu sürdürmektedir (Lorber 1997).



Resim 3. *Listeria monocytogenes*'in hücreler arası geçişi (Portnoy 2002).

1.1.7. İmmun Yanıt

L. monocytogenes'e karşı doğal ve kazanılmış bağışıklıkla immün yanıt verilmektedir. Doğal immün yanıt infeksiyonun başlangıcından hemen sonra hızlı bir şekilde artar ve intrasellüler patojenin eradikasyonuna yol açan kazanılmış spesifik T hücresel immün yanıt oluşuncaya kadar infeksiyonun erken dönemini kontrol altına almak için yararlı olur (North ve Conlan 1998, Orndorf ve ark. 2006).

Listeria türleri, polimorfnükler lökositler (PMNs), makrofaj, dendritik hücre, eritrosit ve hepatositlerde üreyebilmektedir (Dramsı ve ark. 1996, Orndolf ve ark. 2006). *Listeria* infeksiyonunun kontrolü özellikle toll-like reseptörleri (TLRs) aracılığıyla olan doğal immün mekanizmanın hızlı aktivasyonuna bağlıdır (Orndolf ve ark. 2006, Shaughnessy ve Swanson 2007). TLRs, bir çok farklı hücrede bulunan ve doğal immün yanıt ile ilişkili olarak patojenleri tanıyan yapılardır. TLRs aracılığıyla artan sinyaller, pro-inflamatuar sitokinler ve diğer immün mediatörlere sevk edilmesine aracılık etmektedir. TLR₂, *L. monocytogenes*'i de içeren Gram pozitif bakteriler

tarafından oluşturulan infeksiyonların önlenmesinde özellikle önemlidir. TLR₂, lipoteikoik asit, lipoprotein ve peptidoglikanı da içeren bakteri ile ilişkili bir çok molekülü tanımaktadır. TLR₂ sinyali, doğal immun yanıtta rol oynayan pro-inflamatuar sitokin ve kemokinlerin üretimini uyararak, PMN lökositlerin ve monositlerin infeksiyon odağına yönelmesini sağlamaktadır (Orndorf ve ark. 2006).

İnfeksiyonun başlangıcında doğal öldürücü (NK) hücrelerin aktivitesi yükselir ve bu sitolitik hücreler interferon gama (IFN- γ) üreterek doğal immunitede çok önemli bir role sahip olan makrofajların, sitokinlerin (tümör nekroz faktör, interferon) ve nitrik oksit gibi moleküllerin üretimini artırır (Goebel ve W., Kuhn 2000, North ve Conlan 1998, Orndorf ve ark. 2006, Shaughnessy ve Swanson 2007).

Makrofaj ve dendritik hücreler aynı zamanda spesifik anti-listerial T hücre sel bağışıklığın meydana gelmesinde antijen sunan hücreler olarak fonksiyon görürler (Edelson ve Unanue 2000, North ve Conlan 1998, Shaughnessy ve Swanson 2007). Bu hücrelerde *Listeria* türleri, fagozomun yok edici etkisinden kaçmak için virülens faktör olan listeriolizin O salgılar. Dendritik hücrelerde listerial proteinleri (LLO gibi) işlenir ve sonra membran yüzeyinde büyük doku uyumu kompleksi (MHC) sınıf I molekülleri ile naif CD8+ ve CD4+ T hücrelerine sunulurlar (Edelson ve Unanue 2000, North ve Conlan 1998). Dendritik hücreler ayrıca interleukin-12 (IL-12) gibi uyarıcılar üreterek CD8+ T hücrelerinin sitolitik T lenfosit (CTL)'e , CD4+ hücrelerinin de Th1 hücrelerine aktivasyonunu sağlamaktadır (Diker 1998, Orndorf ve ark. 2006).

MHC sınıf I molekülleri, primer bir infeksiyonun giderilmesine aracılık eden, CD8+ CTL'yi sınırlayan ve uzun süren sekonder (hafıza) anti-listerial bağışıklıktan da sorumludur. Duyarlılaştırılmış CD8+ CTL, infekte hücrenin yüzeyindeki MHC sınıf I molekülünün sunduğu LLO peptidlerini tanır ve bağlanır. Bu aktivasyon, MHC sınıf I molekülleri ile kompleksi oluşturan LLO peptidlerini CD8+ CTL hücrelerine sunar (Diker 1998). IFN- γ makrofajların listerial aktivitesini ve sitozol içindeki fagozomda hapsolan *Listeria*'nın

kaçışını önleyen bir tür fagozom modifikasyonunu aktive etmektedir. Infekte konak hücrelerinin sitolizisi önceden intrasellüler patojene duyarlı olan makrofajlar tarafından yapılır. Yapılan çalışmalar listeriozis süresince dalak ve barsak mukozalarında, T hücreleri düzeninin farklı olduğunu göstermiştir. Bu bulgulara göre belirgin immun mekanizmalar farklı anatomik bölgelerde meydana gelmektedir (Orndorf ve ark. 2006).

Listerial antijenler için konak tarafından *Listeria*'ya karşı üretilen IgG ve IgA gibi antikorların son zamanlara kadar koruyucu olmadığı düşünülmekteydi. Ancak son araştırmalar, infeksiyondan konağı korumada anti-LLO antikorlarının önemli olduğunu ortaya çıkarmıştır. Buna göre, *Listeria* içeren vakuoller, makrofajların endositik keseciklerinde oluşturulan spesifik LLO antikorları ile karşılaşmaktadır. *Listeria* tarafından üretilen LLO, anti-LLO antikorları ile nötralize edildiğinde *Listeria* fagozomlar içine alınır. Fagozomdan kaçıştaki başarısızlık nedeniyle *Listeria* veziküllerdeki öldürücü mekanizmaya maruz kalmaktadır (Edelson ve Unanue 2000, Orndorf ve ark. 2006).

1.1.8. Klinik Belirtiler

L. monocytogenes çevrede, sağlıklı hayvan dışkılarında ve toprakta yaygın olarak bulunur. Belli şartlar altında, patojeniktirler ve ciddi infeksiyonlara sebep olurlar (Picoux 2008).

Listeriozisin genellikle sporadik seyrettiği kabul edilirken (Low ve Donachie 1997) zamanla bu durumun, değişerek salgınlara yol açtığı kaydedilmiştir (Erdoğan 1998)

Ruminantlarda listeriozis ensefalitis, abortus, sepsisemi veya endoftalmitis şeklinde seyredebilir (Arda 2000).

Sentral sinir sistemine yerleşebilen *L. monocytogenes*, insanlarda ve hayvanlarda ölüme neden olabilen bir bakteridir. *L. monocytogenes*'in sentral sinir sistemine geçiş mekanizması hakkında az şey bilinse de yapılan çalışmalarla temelde 2 ana yolun bulunduğu varsayılmaktadır. *L.*

monocytogenes'in oral epitelyumdan geçişi genellikle rombensefalite neden olurken, organizmanın hematojen yolla yayılımı özellikle insanlarda beyin-kan bariyerinden geçişle sonuçlanır (Disson ve Lecuit 2012).

Nöral listeriozisin (dönme hastalığı) klinik belirtileri, bireysel vakalarda değişken olmakla birlikte genellikle sersemlik, dilde paraliz, başın eğilmesi, bir tarafa dönmesi ve daire şeklinde yürümedir (Arda 2000). Meningoensefalit formunda ölümler solunum kolapsından ileri gelmektedir. Morbidite oranı düşük olmasına rağmen mortalite oranı genellikle yüksektir (Akça 2010).

L. monocytogenes'in sebep olduğu listerial abortlar ruminantlarda ve pek çok evcil hayvan türünde görölmektedir. Abort gebeliğın her döneminde görölebilsede çoğunlukla gebeliğın son üç aylık evresinde daha yaygın göröür. Klinik belirtiler aniden ortaya çıkmaktadır. Listerial abortların insidensi %15'lere kadar çıkabilir. Canlı doğan yavruların hayatta kalma ihtimalleri çok zayıftır (Erdoğan 1998).

Abort gebeliğın son üç ayının erken döneminde meydana gelmiş ise, plasenta bakterilerce işgal edilir ve fötüs septisemiden ölebilir. Ölü fötüsün dışarı atılamaması durumunda, bakterilerin oluşturduğu lezyonları otolitik değişiklikler örtmektedir. Çoğunlukla fötal membranların atılamaması ile sonuçlanan bir metritis oluşur (Akça 2010). Abort son döneme yakın meydana gelmiş ise, canlı doğum gerçekleşse de yavrunun yaşaması çok zordur (Arda 2000).

Septisemi ve latent infeksiyon organizmanın inhalasyon ya da gıdalarla alınmasıyla ortaya çıkmaktadır. *L. monocytogenes*'in oral olarak alınmasından sonra mikroorganizma çeşitli hücrelerde görölebilir (Erdoğan 1998). Bazen gebe koyunlarda görölebilmekle birlikte en sık yeni doğanlarda intrauterin infeksiyonun uzantısı olarak ortaya çıkmaktadır (Arda 2000).

Sığırlarda ve koyunlarda görölen keratokonjuktivitis ve iritis (okuler listeriozis) sıklıkla tek taraflı ve kontamine silajla doğrudan temasla oluşur. *L.*

monocytogenes'in neden olduğu az sayıda mastitis vakaları da bildirilmiştir (Arda 2000).

İnsan infeksiyonları genellikle çiğ süt, krem peynir, lahana salatası, pişmemiş sebzeler, et ve balık ürünleri, dondurulmuş gıdalar gibi kontamine gıdaların tüketilmesiyle ortaya çıkmaktadır. İmmunsuprese bireylerde, menenjit, ensefalit, düşük ve ölü doğumlar, endokardit, faranjit ve septisemiye neden olurken, sağlıklı bireylerde genellikle influenzaya benzeyen hafif ateşli bir hastalığa neden olmaktadır (Arda 2000). Kaydedilmiş vakalar içinde insan yaşamını tehdit eden üç klinik sendrom; maternafetal listeriozis ya da neonatal listeriozis, kan dolaşımıyla yayılan listeriozis ve meningoensefalitistir. Bu sendromlardan başka, listeriozis focal olarak da seyredebilir. Focal infeksiyonlar genellikle periton, eklemler, endokardiyum ya da gözlerde görülmektedir (Swaminathan ve Gerner-Smidt 2007).

Suşlar arasındaki virülensin farklı olması, infeksiyonun ortaya çıkışının ve klinik seyrinin farklı olmasına sebep olabilir. Gıdalardan ve gıda üretilen ortamlardan sıklıkla izole edilen suşlar 1/2a, 1/2b ve 1/2c suşlarıdır. Fakat insan infeksiyonlarının %95'inden fazlası 1/2a, 1/2b ve 4b suşları tarafından oluşturulur. Çoğu *Listeria* salgınına ise 4b suşunun neden olduğu kaydedilmiştir (Swaminathan ve Gerner-Smidt 2007).

Gıda tüketildikten 12 saat sonra ateş, karın krampları, diyare, yorgunluk, baş ağrısı ve kusma ile seyreden gastrointestinal bir sendrom meydana gelmekte ve listeriyal menenjit ve bakteriyemi gibi daha ciddi durumlar ancak günler veya haftalar sonra ortaya çıkmaktadır. Bu sendromların başlama süresi 11-70 gün arasında (ortalama 21 gün) değişmekte olup, bu sürenin enfektif doza ve hastanın durumuna bağlı olduğu bildirilmektedir (Yavuz ve Korukluoğlu 2010).

1.1.9. Teşhis

Listeriozisin klinik teşhisi, diğer bazı infeksiyonlarla karıştırılabileceğinden zordur (Arda ve ark 1997). Listeriozisin teşhisinde kültürel yöntemlerle izolasyon ve identifikasyon yapılabileceği gibi, serum aglütinasyon testi, komplement fikzasyon testi ve daha duyarlı olduğu bildirilen ELISA gibi serolojik testlerden de yararlanılmaktadır (Güven 1994, Erdoğan 1998, Erdoğan ve ark. 1999, Hasöksüz ve Ilgaz 2000, Kennerman ve ark. 2000, İkiz 2007). Flow cytometric metodu (Donnelly ve Baigent 1986), rapid screening test (Evanson ve ark. 1991) ve son zamanlarda PCR (Polymerase Chain Reaction) tekniği de teşhis amacı ile kullanılmaktadır (Bubert ve ark. 1999, Bubert ve ark. 1992, Holko ve ark. 2002).

1.1.10. Sağaltım

Listeriozisin tedavisi erken dönemlerde ümit vericidir, uzun periyotlu antibiyotik tedavisine cevap vermektedir (Picoux 2008). Ensefalitik Listeriozis vakalarında tedavi çok zordur. Koyunlarda hastalık kısa ve şiddetli seyrettiği için, sığırlara göre tedavi daha zordur (Erdoğan 1998).

1.1.11. Koruma

Bakteri evcil hayvanlar, kuşlar, balıklar, memeli hayvanlar ve taşıyıcı insanların dışkılarından izole edilebildiği için doğada her yerde yaygın olarak bulunabilmektedir. Süt, süt ürünleri, et ürünleri ve hayvan dışkısıyla bulaşmış gıda maddelerindeki bakteri özellikle gıda maddelerinin soğukta (+4 °C) saklanması sırasında çoğalır ve infeksiyona neden olur. İnsandan insana bulaşmada genital yolun rol oynadığı bilinmektedir. Korunma için steril koşullarda hazırlanmış besinlerin tüketilmesi ve buzdolabında bulunması gereken maddelerin hijyenik kurallara uygun saklanması gerekmektedir. (<http://www.mikrobiyoloji.org>, 5.4.2013). Yine kontamine olan sütlerde kaynatma veya imha yöntemi kullanılmalıdır. Hayvanların beslenmelerinde bozuk ve çürümüş yemler kullanılmamalı, silaj pH değeri 5'in altına indirilmelidir (Şahin 2007).

1.2. Bakteriyofajlar

Günümüzde patojen bakterilerdeki çoklu antibiyotik direnci ve bu mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonların immun sistemi baskılanmış hastalardaki artışı kritik bir sorun olmaya başlamıştır. Bakterilerdeki antibiyotik direnç probleminin giderek önem kazanması anti-infektif modellerin modern tıpta ve biyoteknolojide öncelik kazanmasına neden olmuştur. Antibiyotiklerin keşfi ve yaygın kullanımlarından önce, litik faj terapisi konvansiyonel antibiyotiklere alternatif olarak önerilmiştir. Klinik çalışmalarda bakteriyofajların çeşitli patojenlerin neden olduğu infeksiyonların tedavisinde oldukça etkili oldukları görülmektedir. Bakteriofajlar (fajlar), bakterilerin virusları olup, bakteri hücresi içine girerek metabolizmasını bozar ve litik faj durumunda bakterinin parçalanmasına neden olurlar. Bakteriyofajlar ile ilgili ilk gözlemler, 1896 yılında Ernest Hankin tarafından yapılmıştır. 1915 yılında d'Herelle bakteriyofajları keşfetmiş ve 1916 yılında da bakteri yiyen anlamında "bakteriofaj" olarak isimlendirmiştir. d'Herelle, bakteriofajları terapötik amaçlı olarak ilk kez dizanteri tedavisinde kullanmıştır. Faj terapisi, bazı koşullarda oldukça etkili ve antibiyotiklerle karşılaştırıldığında eşsiz bazı avantajlara sahiptir. Bakterilerde antibiyotiklere olduğu gibi fajlara karşı da direnç gelişimi söz konusudur. Ancak yeni bir bakteriyofajın elde edilmesi, yeni bir antibiyotiğin geliştirilmesi ile kıyaslanmayacak kadar kolaydır. Birkaç hafta/yıl sonra dirençli yeni bakteri suşları için yeni fajların bulunmasına ihtiyaç duyulur. Direnç kazanan bakteri yanında ilgili faj da doğal olarak direnç kazanır ve süper bakteri ortaya çıktığında, süper faj bakteriyeye saldırır. Bu noktada fajın aynı çevreden elde edilmesi gerekir. Fajların lokal kullanımlarının bazı avantajları vardır. Enfeksiyon durumunda derin dokulara hızla penetre olur ve hedef bakteri öldüğünde de üremeleri durur. Antibiyotiklerin aksine fajlarda sekonder direnç gelişimi söz konusu değildir. Antibiyotiklere dirençli bakterilerdeki artış yanı sıra etkili yeni sınıf antibiyotiklerin geliştirilmesindeki eksiklikler, fajların infeksiyonların tedavisinde kullanımlarını gündeme getirmiştir (Sulakvelidze 2001). Bir bakteriyeye karşı farklı coğrafi alanlardan ve farklı örneklerden faj izolasyonu yapılması oldukça önem taşımaktadır. Fajlarla yapılan

dekontaminasyon ve tedavilerde lokal fajlar önemli olduğu gibi faj çeşitliliğinin artırılması da oldukça önem taşımaktadır. Bir faja karşı direnç gelişirken diğer faj ya da fajlar hedef bakteriyi lize etmektedirler. Dolayısıyla bir bakteriye karşı izole edilecek fajların lokal olması önem taşımaktadır (Boyd ve Brüssow 2002).

Listeria'ya özgü bakteriyofaj (listeriafaj)'ın, ilk olarak 1942 yılında Tom Anderson tarafından elektron mikroskopik görüntüsü elde edilmiştir. Batılı bilim adamları 1940'lardan sonra penisilin ve diğer antibiyotiklerin keşfinden sonra faj çalışmalarını bırakırken, Eski Sovyetler Birliğinde (özellikle Gürcistan), bazı Doğu Avrupa ülkeleri ve Amerika faj izolasyonu yapmaya devam etmiştir. Fajların keşfinden günümüze kadar faj tedavisi için çeşitli preparatlar hazırlanmış ve kullanılmıştır. Sınır komşumuz olan Gürcistan'da (ELIAVA Enstitüsü/Tiflis) insanlar üzerinde fajlarla tedavi uygulamaları yapılmaktadır (<http://www.eliava-institute.org/> 2.6.2013). Birleşik Devletler Food and Drug Administration (US FDA), 2006 yılında listeriafajların hazır et ve tavuk ürünlerinin yüzeylerinde kullanılmasını onaylamıştır (Kim 2008). Günümüzde diş sağlığını korumak için doğal karışım olarak (Chkonja 2012), mastitis etkenlerine karşı (Donjacour ve Paros 2012), süt hijyenini sağlamak için (Endersen 2012), menenjit ve sepsise karşı (Pouillot ve Gabard 2012), kısacası etkeni bakteriler olan sorunlarla mücadele için fajların kullanımına ilişkin deneysel çalışmalar yapılmaya devam etmektedir.

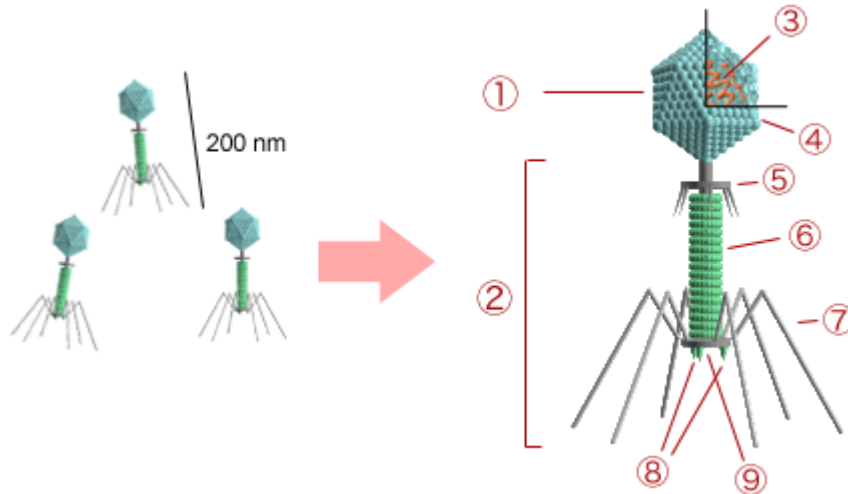
Fajlar konakçısına özgü olduklarından, bakterilerin identifikasyonlarında da kullanılmaktadırlar. Günümüze kadar gıdalar, atık sular, silaj ve lizojenik suşlar gibi çeşitli kaynaklardan en az 400 listeriafaj izole edilmiştir. Bu fajlar epidemiyolojik çalışmalarda suşların tiplendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Günümüzde yapılan çalışmalar, bu fajların *Listeria*'ların kontrolü amacıyla da kullanılabileceğini göstermektedir (Kim ve ark. 2008).

1.2.2. Yapısal Özellikleri ve Çoğalmaları

1.2.2.1. Yapısal Özellikleri

Bakterilerin, filtreden geçebilen bazı ajanlar tarafından lize edildiğini ilk olarak bildiren d'Herelle, bu lizis olayının mikroskopla görülemeyen mikroorganizmalar tarafından oluşturulduğunu bildirmiş ve bunlara "bakteri yiyen" anlamına gelen bakteriyofaj adını vermiştir (Arda 2000).

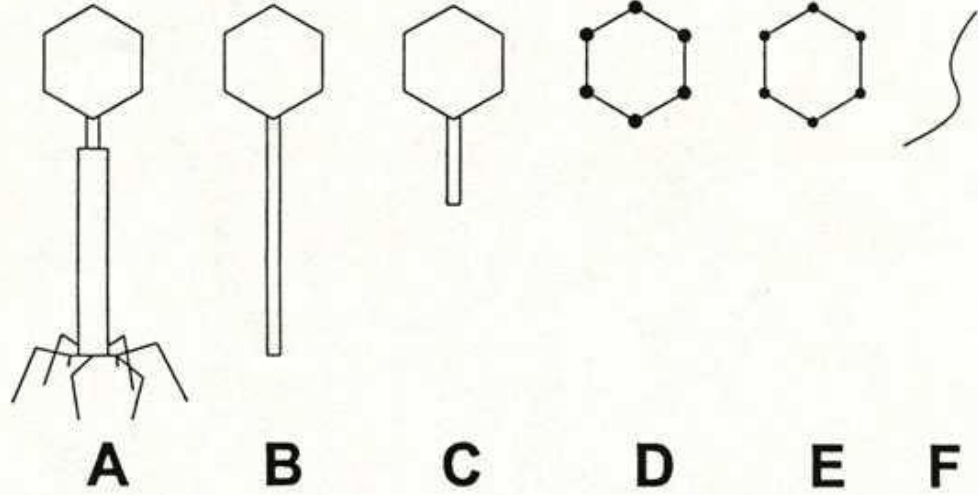
Fajlar bakterileri ve arkebakterileri infekte edebilen virüslerdir. 1959'da yapılan ilk negatif boyamadan, 2006 yılına kadar en az 5568 faj elektron mikroskopuyla incelenmiştir. Bunların çoğu (%96) kuyruklu, yalnızca 208 tanesi (%3.8) ise polihedral, filamentöz ya da pleomorfiktir (Ackermann 2003). Tüm fajlar protein bir kılıf (kapsid) tarafından korunan nükleik asit (genom) içerirler. Faj genomu, çift iplikçikli DNA, tek iplikçikli DNA ya da tek iplikçikli RNA şeklinde olabilir. Kapsid, küçük heksagonal yapılardan, filamentli yapılara, baş ve kuyruktan oluşan kompleks yapılara kadar değişebilen çeşitli formlarda olabilir (Goodridge ve Abedon 2003).



Resim 4. T4 bakteriyofajının yapısı. 1. Baş, 2. Kuyruk, 3. Nükleik asit, 4. Kapsit, 5. Yaka, 6. Kın, 7. Kuyruk lifleri, 8. Ekserler, 9. Taban plakası. (<http://tr.wikipedia.org/wiki/Bakteriyofaj>, Erişim: 20.12.1013)

Kısaca faj olarak adlandırılan bu ajanların yapılarındaki farklılıklar çeşitli sınıflandırmaların ortaya çıkmasına neden olmuştur.

Bradley sınıflandırmasına göre, fajların morfolojik özellikleri göz önüne alınarak fajlar 6 morfolojik sınıfa ayrılmıştır (Resim 5) (Arda 2000).



<u>Tip</u>	<u>Nükleik Asit</u>	<u>Özellik</u>	<u>Örnek</u>
A	DNA, 2, L	Polihedral baş, uzun kuyruk etrafında kontraktıl kılıf kuyruk levhası (hegzagonal) kuyruk iğnesi ve fibrilleri	T2, T4, T6
B	DNA, 2, L	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan uzun kuyruk	T1, T5, λ
C	DNA, 2, L	Polihedral baş, kontraktıl kılıfı olmayan kısa kuyruk	T3, T7, P22
D	DNA, 1, C	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok büyük kapsomer	ϕ X174, S13
E	RNA, 1, L	Kuyruksuz, ikosahedral baş, kapsid üzerinde çok küçük kapsomer	F2R17, Fr, MS2
F	RNA, 1, L	Fleksibl filamentöz	FE, fd, M13

1: Tek iplikçik

L: Lineer

2: Çift iplikçik

C: Sirküler

Resim 5. Fajların Bradley sınıflandırmasına göre morfolojik özellikleri (Arda 2000).

Daha sonra Ackermann tarafından yapılan sınıflandırmada fajların morfolojik özelliklerinin yanında nükleik asit yapılarını da dikkate almıştır (Tablo 3) (Ackermann 1987).

Tablo 3. Ackermann Klasifikasyonu (Ackermann1987).

Şekil	Nükleik Asit	Familya	Cins	Özellik	Örnek	Bradley
I)Kuyruklu Fajlar	DNA,2,L	Myoviridae	-	Uzun kuyruk,kontraktıl	T4	A
		Styloviridae	-	Uzun kuyruk, nonkontraktıl	Lambda	Bradley
		Podoviridae	-	Kısa kuyruk	T7	C
II)Kübik Simetrlili Fajlar	DNA,1,C	Microviridae	Microvirus	İri kapsomerli,kompleks kapsid,lipid çift kapsid Pseudo kuyruk,lipid	ØX147	E
		Corticoviridae	Cortivirus		PM2	
	2,C,S	Tectiviridae	Tectivirus		PRD1	
	2,L	Leviviridae	Levivirus	Zarflı,lipid	MS2	
III)Filamentöz Fajlar	DNA,1,C	Cystoviridae	Cystovirus		Ø6	F
		Inoviridae	Inovirus	Uzun, çomak kısa çomak	Fd	
IV)Pleomorfik	DNA,2,C, S	F3 grubu	-	zarflı, lipid	MVL1	
					Plasmaviridae	

1.2.2.2. Çoğalmaları

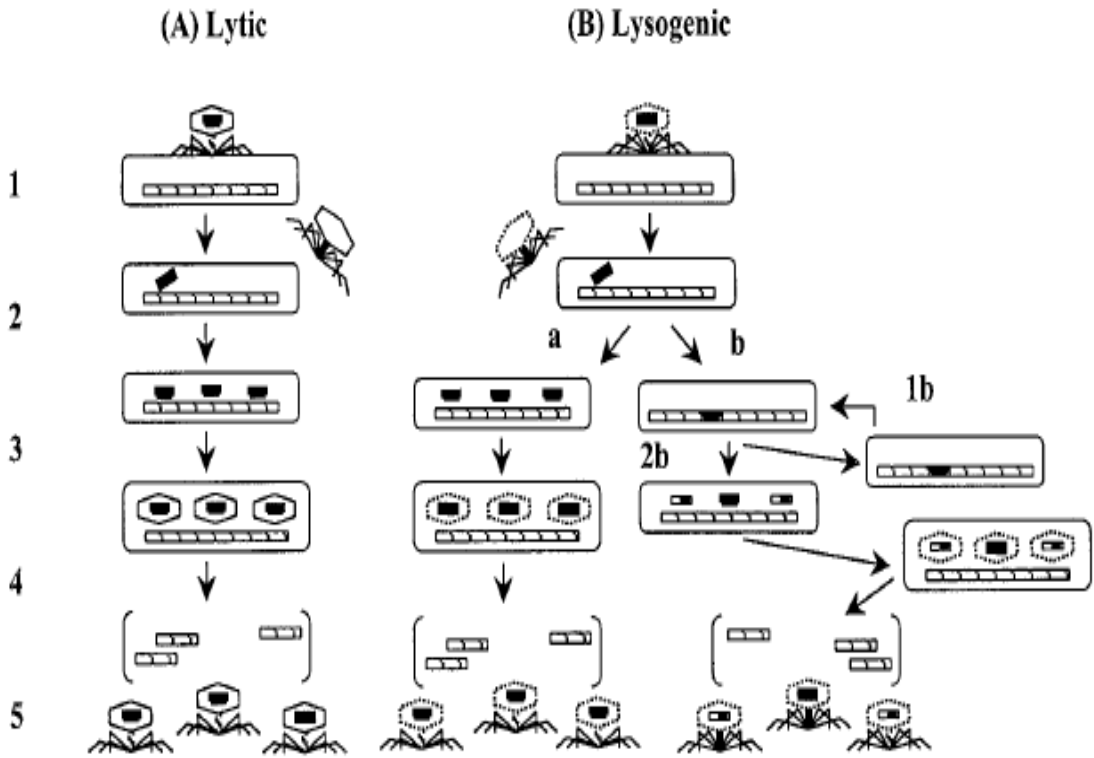
Bakteriyofajlar, konakçı hücrede çoğalabilmek için bazı mekanizmalar geliştirmişlerdir. Hayat döngüleri litik, lizojenik ya da kronik infeksiyon şeklinde seyretilmektedir. Kronik infeksiyon, fajların konakçı hücre içerisinden, hücreye zarar vermeden, tomurcuklanma şeklinde çıkıntılar oluşturarak ayrılması şeklinde meydana gelen hayat döngüsü şeklindedir. Bu döngü, bazı filamentöz fajların kullandığı bir mekanizmadır (Klaus ve ark. 1992, Ackermann 2003).

Bakteriyofajların çoğu litik ya da lizojenik hayat döngüsüne sahiptir. Virülent fajlar, konakçı hücrenin hasar göreyerek parçalanmasıyla sonuçlanan

litik döngüyle çoğalırken, ılımlı (temperate) fajlar konakçı hücrenin genomuna entegre olarak, konakçı hücre genomuyla birlikte replike oldukları lizojenik hayat döngüsü gösterirler (Dorscht 2007).

Litik hayat döngüsünde başlıca 4 aşama vardır; adsorbsiyon, nükleik asidin konakçı hücreye injeksiyonu, replikasyon ve fajların serbest kalması. Bakteriyofajlar pasif olarak, çekimle konakçı hücreyle karşılaşır ve irreverzibl olarak, tanınan konakçı hücreye adsorbe olurlar. Geri dönüşü olmayan bağlantı, konakçı hücredeki spesifik reseptörlere bağlanıldığında gerçekleşir. Penetrasyon aşamasından sonra, bakteriyofaj genomu hücre içine salınırken, kapsid hücre dışında kalır. Faj genomunun transkripsiyon ve replikasyonu, konakçı hücrenin biyosentez mekanizması sayesinde gerçekleşir. Yeni faj parçaları konakçı hücre sitoplazmasında bir araya gelir. Yeni oluşan fajlar, olgunlaştıktan sonra konakçı hücrenin sitoplazmik bütünlüğünün bozularak lizise uğramasıyla dışarı çıkarlar. Bazı kuyruklu fajlarda lizis; hücre duvarında porlar açılmasına neden olan holinlerin ve hücre duvarında peptidoglikan tabakaya etki ederek bütünlüğünü bozan lizinlerin rol aldığı, “dual lizis sistemi” ile tamamlanır (Wang ve ark. 2000, Young ve ark. 2000). Lizojenik hayat döngüsünde faj genomu, profaj olarak konakçı hücre genomuna integre olur ve hücre bölünmesi sırasında bakteriyel DNA ile birlikte replike olarak tüm yeni hücrelere aktarılırlar (Resim 6). Bazı bakteriyofajlar plasmidler gibi kendi kendine de replike olabilmektedirler (Klaus ve ark. 1992).

Genellikle stabil olmasına rağmen, lizojenik faj her zaman profaj olarak kalmayabilir. Profajın vejetatif forma dönmesi ve fajın farklı faj-spesifik aşamalarda litik hayat döngüsüne geçme ihtimali vardır. UV, radyasyon ve mitomisin C gibi DNA hasarına neden olan maddeler fajların lizojenik hayat döngüsünden tekrar litik hayat döngüsüne geçişini tetikleyebilir (Loessner ve ark. 1991).



Resim 6. Fajların litik ve lizojenik hayat döngüleri. (A) Litik fajlar; 1. Tutunma aşaması, 2. Bakteriyofaj genomunun konakçı hücresi içine alınması, 3. Konakçı hücre bileşenlerinin sentezlenmesi, faj DNA'sının replikasyonu, yeni kapsidlerin oluşması, 4. Yeni faj yapılarının tamamlanması, 5. Olgun fajların hücre dışına çıkması. (B) Lizojenik fajlar; 1. ve 2. aşamalar litik fajlarla aynıdır. 3. Lizojenik fajlar döngülerine özelliklerine göre, litik fajlardaki gibi (a) ya da konakçı hücre DNA'sına entegre olarak lizojenizasyonla devam edebilirler (b). Lizojen hücreler (profaj ile birlikte) nesiller boyunca normal olarak çoğalabilir (2b) ya da spontane olarak ya da DNA hasarına neden olan maddelerin indüklemesi ile konakçı DNA'dan ayrılarak litik forma dönebilir (2b) (Sulakvelidze 2001).

1.2.3. Antimikrobiyal Ajan Olarak Bakteriyofajlar (Faj Terapisi)

Fajlar keşfedildikten çok kısa bir sonra d'Herelle tarafından dizanteri tedavisi için kullanılmıştır ve bu deneme fajların ilk terapötik kullanımınıdır. Bu denemeden sonra başka dizanteri hastalarında tek doz faj tedavisine devam edilmiş yaklaşık 24 saat içinde fajların tedavi edici olabildiği, birkaç gün içinde de tamamen iyileşmenin olabildiği gözlemlenmiştir. Bu çalışmalar hemen yayınlanmamıştır (Sulakvelidze 2001).

Faj tedavisi konusunda yayımlanan ilk çalışma *Staphylococcus* türlerinin neden olduğu deri hastalığı üzerine Richard Bruynoghe ve Joseph Maisin'in yaptığı çalışmadır (Bruynoghe ve Maisin 1921). Yapılan bu çalışmada da daha önceki denemelerle benzer şekilde 24-48 saat içinde hastalığın seyrini geri döndürerek iyileştirdiği görülmüştür. Benzer çalışmalar devam etmiş ve daha önceki çalışma sonuçlarını doğrular nitelikte olmuştur. d'Herelle daha sonra hazırladığı çeşitli faj preparatlarıyla Hindistan'da kolera hastaları ile çalışmalarına devam etmiştir (Rice 1930, Schless 1932, Stout 1933, Summers 1999)

Bakteriyofajlar bazı firmalar tarafından ticari preparatlar şeklinde de sunulmuştur. d'Herelle'nin Paris'teki laboratuvarında ürettiği 5 faj preparatı (Bacté-coli-phage, Bacté-rhinophage, Bacté-intesti-phage, Bacté-pyo-phage, and Bacté-staphy-phage), Fransız şirketi L'oréal tarafından pazarlanmıştır (Summers 1999). 1940'larda Amerika Birleşik Devletleri'nde de ticari preparatlar hazırlanmıştır. Eli Lilly Firması, 6 adet fajı insanların kullanımına sunmuştur. Bu preparatlar, apseler, iltihaplı yaralar, vajinitis, akut ve kronik üst solunum yolları hastalıkları ve mastoidit gibi hastalıklarda kullanılmışlardır (Sulakvelidze 2001). Beklentilerin aşırı yükseldiği bu dönemden sonra, II. Dünya Savaşı sonrası bakteriyofaj kullanımının yerini antibiyotiklerin almasıyla, batı dünyasında faj konusunda beklentiler azalmış, ancak çalışmalara Sovyet Rusyası ve Doğu Avrupa ülkelerinde devam edilmiştir (Eaton ve Bayne-Jones 1934). Faj çalışmaları İngiliz literatürlerine Smith ve Huggins'in çalışmasıyla 1980'lerde tekrar girmiş (Smith ve Huggins 1982), bu çalışmalar 1990'larda hızlanmıştır. Ancak bu zamana kadar Rusya ve Polonya literatürlerinde fajlarla ilgili yapılmış çalışmalar oldukça fazladır. Batı dünyasındaki çalışmalar 2000'li yıllarda olgunlaşmış ve genomik, ekolojik temelli faj çalışmaları ve faj temelli tedavi çalışmaları ile devam etmiştir ve günümüzde de etmektedir (Abedon ve ark. 2011).

Tablo 4. Sovyet Rusya ve Polonya’da yapılan başlıca faj tedavisi çalışmaları (Sulakvelidze 2001).

İnfeksiyon	Etken	Yorumlar
Bakteriyel dizanteri	<i>Shigella</i>	<i>Shigella</i> fajları profilakside başarıyla kullanılmıştır.
Deri ve nazal mukoza infeksiyonları	<i>K. ozaenae</i> , <i>K. rhinoscleromatis</i> ve <i>K. pneumoniae</i>	Klebsiella infeksiyonu olan 109 hastada başarı sağlanmıştır.
İltihaplı deri infeksiyonları	<i>Pseudomonas</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> ve <i>E. coli</i>	Lokal ve oral olarak faj alan 31 kronik deri hastalığı olan hastada %74 başarı oranı görülmüştür
Akciğer ve pleura hastalığı	<i>Staphylococcus</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>E. coli</i> ve <i>Proteus</i>	45 hastada antibiyotikle birlikte kullanılan fajlar kullanılmıştır.
Kanser hastalarında operasyon sonrası yaralar	<i>Staphylococcus</i> ve <i>Pseudomonas</i>	131 hastadan 65’ine faj diğerlerine antibiyotik verilmiş, faj tedavisi alanlarda %82 başarı, antibiyotik alanlarda %61 başarı sağlanmıştır.
Çeşitli infeksiyonlar	<i>Staphylococcus</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas</i> ve <i>Proteus</i>	Fajlar 57 hastada immunojenite yönünden incelenmiş, immun sistemi baskılamadığı görülmüştür.
Tekrarlayan apseler	<i>E. coli</i>	Antibiyotik dirençli <i>E. coli</i> ’nin neden olduğu apseler başarıyla tedavi edilmiştir.
İntestinal disbakterioz	<i>E. coli</i> ve <i>Proteus</i>	Antibiyotik kullanımıyla ilgili 500 düşük doğum ağırlığına sahip bebekte fajlar bifidobakterilerle birlikte başarıyla kullanılmıştır.
Akciğer ve pleural infeksiyonlar	<i>Staphylococcus</i>	Faj kullanılan 223 hasta ile antibiyotik verilen 117 hasta karşılaştırıldığında, faj kullanılanların %82 sinde tamamen iyileşme, antibiyotik kullanılanların %64 ünde iyileşme görülmüştür.
İltihaplı ürolojik hastalıklar	<i>Staphylococcus</i> , <i>E. coli</i> ve <i>Proteus</i>	46 hastanın %92’sinin klinik belirtileri tedavi edilmiş, %84

		ünün tamamen bakteriyel olarak temizlendiği görülmüştür.
Peritonit, osteomyelit, akciğer apsesi ve cerrahi sonrası yara enfeksiyonları	<i>Staphylococcus, Streptococcus ve Proteus</i>	Subkutanöz ya da direkt yara üzerinde kullanılan fajlar 236 hastada antibiyotik dirençli hastada %92 oranında iyileşme sağlamıştır.
Rinit, farenjit, dermatit ve konjonktivit	<i>Staphylococcus, Streptococcus, E. coli, Proteus, Enterococci ve P. aeruginosa</i>	1380 hastanın 360'ı faj, 404'ü antibiyotik, 576'sı antibiyotik ve fajı birlikte almış, sırasıyla %86-48-83 başarı gözlemlenmiştir.
Gastrointestinal sistem, deri, baş ve boyun enfeksiyonları	<i>Staphylococcus, Pseudomonas, E. coli, Klebsiella ve Salmonella</i>	550 hasta üzerinde uygulanan faj tedavisinde %92 oranında başarı elde edilmiştir.
Serebrospinal menenjit	<i>K. pneumoniae</i>	Yenidoğanlarda oral yoldan faj kullanımının başarılı olduğu görülmüştür (başarısız antibiyotik tedavisi sonrası).
Bakteriyel dizanteri	<i>E. coli ve Proteus</i>	59 immunsuprese lösemi hastasında bifidobakterilerle birlikte faj kullanımının, antibiyotik kullanımından daha başarılı olduğu görülmüştür.
İltihaplı enfeksiyonlar	<i>Staphylococcus</i> ve çeşitli Gram negatif bakteriler	56 hastada tedavi başarılı olmuştur ve hastaların kan ve idrarlarında yoğun faja rastlanmıştır.
İltihaplı cerrahi enfeksiyonlar	<i>Staphylococcus, Streptococcus, E. coli ve Proteus</i>	60 hastada, hastanın kendisinden izole edilen fajların, ticari faj preparatlarından üstünlüğü görülmüştür.

Bakteriyofaj kullanımının teorik olarak antibiyotik kullanımından birçok üstünlüğü bulunmaktadır. Ancak yakın gelecekte, hasta uyumu, fajların

etkinliği ve yan etkileri hakkında inandırıcı bilimsel çalışmalar mevcut olmadığından antibiyotiklerin yerine kullanılabilmesi olası grnmemektir (Cooper 2011). Aşağıdaki tabloda teorik olarak fajların antibiyotiklere üstünlüğü özetlenmiştir.

Tablo 5. Antibiyotik ve bakteriyofajların profilaktik ve/veya teröpatik olarak kullanılmalarının karşılaştırılması (Sulakvelidze 2001).

Bakteriyofajlar	Antibiyotikler	Genel Yorumlar
Yüksek spesifite gösterir.	Genellikle mikroflora hasarına neden olurlar.	Yüksek spesifite patojen tanımlaması gerektirir
Düşük direnç seviyesi gösterir.	Birçok antibiyotiğe karşı yükselen direnç seviyesi vardır.	Birçok konakçıya karşı faj geliştirilebilir.
Aktif olarak replike olabilirler.	Vücuttan tamamen temizlenirler.	Fajla daha az sıklıkla uygulanabilir.
Yan etkisi bilinmemektedir.	Bazıları alerjik reaksiyonlara, bazıları yüksek dozda toksik etkiye sahiptir.	Faj terapisi, bakteriyel lizis sonucu toksik çok ile sonuçlanabilir.
Faj izolasyonu kolaydır ve maliyeti azdır.	Yıllar sürebilir ve daha maliyetlidir.	Fajların antibiyotik dirençli bakterilere karşı da doğal seleksiyonla etki edebileceği dşnlmektedir.

1.2.4. Bakteriyofajların Günümüzdeki Kullanımları

Bakteriyofajların terapötik olarak kullanılmaları hakkında fajların doğada yaygın olarak bulunmasından ve bunlara hem topikal hem de enterik olarak zaten maruz kalıyor olduğumuzdan yola çıkarak güvenli olduğu şeklinde yetersiz bir bilgi mevcuttur. Yine, daha önce yapılmış olan teröpatik amaçla bakteriyofajların kullanımı ile ilgili çalışmalarda, fajların insan sağlığına herhangi bir zararı gözlemlenmediği için fajların nispeten çok az zararlı olabileceği ihtimaline inanılmaktadır (Miedzybrodzki ve ark. 2012). Bir başka çalışmada ise immunsuprese bireylerde faj kullanımında herhangi bir

toksik ya da ters bir etkiye rastlanmamıştır (Barrow ve Soothill 1997). Bu bilgiler ışığında, fajların sitotoksik etkisi konusunda herhangi bir çalışma yayımlanmaması şaşırtıcıdır. Bilim adamı Du Bow bu konuda “ fajlar hakkında bildiğimiz ve elde ettiğimiz bütün bilgiler etkin teröpatik koşullarda doğrulanmaya muhtaçtır” demiştir (Pirisi 2000).

Bakteriyofajlar terapötik olarak öncelikle Sovyet Rusya döneminde insanlar üzerinde kullanılmış olmasına rağmen, günümüzde batı dünyasında bazı ticari preparatlar özellikle gıda endüstrisinde kullanım alanlarına sahiptir. Günümüzde ticari olarak mevcut ürünlerden biri, Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından 2006 yılında onaylanan, 6 farklı faj kombinasyonundan oluşan, hazır et ürünleri ve kanatlı hayvan ürünleri üzerine uygulanan preparatlardır. Bu ürün, Amerika Birleşik devletlerinde her yıl 2500 civarında vakaya neden olan ve %20 ölümle seyredabilen *L. monocytogenes* etkeniyle mücadele için kullanılmaktadır (Lang 2006). Yine et endüstrisinde *Salmonella* türleri içinde faj preparatları önerilmiştir (Atterbury ve ark. 2007). FDA tarafından onaylanmış ve peynirlerde *E. coli* kontaminasyonuna karşı kullanılan ticari bir preparat mevcuttur (<http://www.intralytix.com>, Erişim: 25.4.2014). Uzak Doğu’da marketlerde satılan dondurulmuş balık ürünlerinde kullanılan preparatlar mevcuttur (Nakai and Park 2002). Yine Amerika Birleşik Devletlerinde pestisit gibi tarım ürünlerinde kullanılan çeşitli ticari preparatlar mevcuttur (Jones 2007). Aşağıda (Tablo 6) günümüzde ticari olarak kullanılan başlıca ticari faj preparatları gösterilmiştir.

Tablo 6. Bazı ticari şirketlerin lisanslı ticari bakteriyofaj preparatları. (¹; ürün adı olmadığını gösterir). (Cooper 2011).

Şirket	Ürün Adı/Tip	Hedef Organizma	Lisanslama Aşaması
Intralix	ListShield™ Faj Koyteyli	<i>L. monocytogenes</i>	FDA ve USDA gıda üzerine direkt uygulamayı onayladı. EPA yüzeysel uygulamayı onayladı. EU onayladı.
	EcoShield™ Faj Kokteyli	<i>E. coli</i> O157:H7	Şirketin internet sitesinde herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.. Diğer bakteriler üzerine araştırmalar devam etmektedir.
AmpliPhi Biosciences	Biophage-PA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Faz III klinik denemeleri devam etmektedir.
Gangagen	StaphTAME: Rekombinant Faj Proteini	Metisilin dirençli <i>S. aureus</i>	Faz I öncesi çalışmalar devam etmektedir.
Novolytics	N/A ¹	Metisilin dirençli <i>Staph. aureus</i>	Yalnızca litik fajlarla çalışılmaktadır.
Omnilytics	Agriphage™	<i>Xanthomonas campestris pv. vesicatoria</i> , <i>Pseudomonas syringae pv. tomato</i>	Ticari olarak mevcuttur.

1.2.5. *Listeria monocytogenes*'e Özgü Fajlar

1945 yılında *Listeria* spesifik fajların ilk izolasyonundan (Schultz, 1945) günümüze kadar, çevresel kaynaklardan ya da lizojenik suşlardan, yaklaşık 400 *Listeria* fajı izole edilmiştir. 120'den fazla fajın elektron mikroskopunda *Caudovirales* takımına dahil oldukları ve iki farklı morfotip gösterdikleri ortaya çıkmıştır. Çoğu bakteriyofaj B1 morfotip adı verilen, izomerik kapsidli, uzun-kontraktil olamayan kuyruklu, genellikle esnek olan gruba dahildir. Bunlar *Siphoviridae* familyasına dahildir (Rocourt 1986, Zink ve Loessner 1992). Günümüze kadar yalnızca çok az sayıda kontraktil kuyruklu ve izomerik kapsidli olarak tanımlanmıştır (morfotip A1). Bu tipteki fajlar *Myoviridae* familyasına aittir (Rocourt 1986, Zink ve ark. 1995).

Listeria fajları genel olarak cins spesifik fajlardır. İlimli fajlar oldukça dar bir konakçı aralığında etkinlik gösterirler ve bakterilerin belirli serovar gruplarına etki ederler (Loessner ve Busse 1990, Loessner 1991). Buna karşın, virülent (litik) fajlar birkaç türü ve serovarı infekte edebilirler. Bu durumun, serovara özgü olmayan, listerial peptidoglikan gibi yapıları, fajların reseptör olarak kullanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir (Wendlinger ve ark. 1996).

Birçok *Listeria* fajı elektron mikroskobu ile incelenmiştir ve yapısal proteinleri, protein profili belirlenmesinde kullanılmıştır. Ancak *Listeria* fajları hakkında genom düzeyinde bilgi çok sınırlıdır (Zink ve Loessner, 1992). Günümüze kadar PSA ve A118 fajlarının genomları sekanslanmış ve analiz edilmiştir (Loessner ve ark. 2000, Zimmer ve ark. 2003). Günümüzde *Listeria* fajlarıyla ilgili yapılan bütün genomu sekanslama çalışmalarında virülent P100 fajı kullanılmış olup sonuçlar A118, fajıyla karşılaştırıldığında oldukça büyük benzerlikler görülmektedir (Carlton ve ark. 2005).

Aşağıdaki tabloda (tablo 7) günümüze kadar en iyi tanımlanan *Listeria* fajları listelenmiştir. Genel olarak bakıldığında bir çok bakteriyofaj izole edilmiş olmasına rağmen çok sınırlı sayıdaki bir kısmı karakterize edilmiştir.

Faj Kodu	Familya	Boyutları (BaşXKuyruk)	Genom Boyutu (bp)	Hayat Döngüsü	Konakçı Serovarı	Uyarılar
01761	<i>Myoviridae</i>	66 × 270	48306	Lizojenik	1/2	
11355C	<i>Siphoviridae</i>	63 × 320			1/2	
11711A	<i>Siphoviridae</i>	63 × 320			1/2	
02971A	<i>Siphoviridae</i>	64 × 307			1/2	
02971C	<i>Siphoviridae</i>	64 × 306			1/2	
90666	<i>Siphoviridae</i>	60 × 311			4	
907515	<i>Siphoviridae</i>	60 × 295			1/2	
10072	<i>Siphoviridae</i>	61 × 292			1/2	
12981	<i>Siphoviridae</i>	63 × 302			1/2	
13441	<i>Siphoviridae</i>	61 × 315			1/2	
00241	<i>Siphoviridae</i>	64 × 300			1/2	
00611	<i>Siphoviridae</i>	63 × 301			1/2	
90861	<i>Siphoviridae</i>	61 × 173			4	
910716	<i>Siphoviridae</i>	60 × 179			4	
93253	<i>Siphoviridae</i>	61 × 171			4	
A005		62 × 280			1/2	
A006	<i>Siphoviridae</i>	62 × 280	38124	Lizojenik	1/2	Transdüksiyon
A020	<i>Siphoviridae</i>	63 × 248		Lizojenik	4,5	

A118	<i>Siphoviridae</i>	61 × 298	40834	Lizojenik	1/2	Transdüksiyon
A500	<i>Siphoviridae</i>	62 × 274	38867	Lizojenik	4	ATCC 23074-BI, Transdüksiyon
A502	<i>Siphoviridae</i>	62 × 302	~39000	Lizojenik	1/2	Lağım suyundan izolasyon, Transdüksiyon
A511	<i>Myoviridae</i>	87 × 199	137619 ^a	Virü lent	1/2, 4, 5, 6	Lağım suyundan izolasyon
A640	<i>Siphoviridae</i>	62 × 305		Lizojenik	4	
B012	<i>Siphoviridae</i>	61 × 286	41464	Lizojenik	5,6	
B021	<i>Siphoviridae</i>	61 × 302		Lizojenik	4	
B024	<i>Siphoviridae</i>	59 × 239	~37000	Lizojenik	5,6	
B025	<i>Siphoviridae</i>	63 × 252	42653	Lizojenik	5,6	
B051 (4211)	<i>Siphoviridae</i>	62 × 245		Lizojenik	5,6	
B053	<i>Siphoviridae</i>	59 × 244	43471	Lizojenik	5,6	
B054 (4286)	<i>Myoviridae</i>	64 × 244	48172	Lizojenik	5,6	
B055 (4295)	<i>Siphoviridae</i>	62 × 242		Lizojenik	5,6	
B056 (5337)	<i>Siphoviridae</i>	59 × 285	~35000	Lizojenik	5,6	
B101	<i>Siphoviridae</i>	61 × 280	40862	Lizojenik	5,6	
B110	<i>Siphoviridae</i>	57 × 288	39390	Lizojenik	5,6	

B545	<i>Siphoviridae</i>	62 × 258		Lizojenik	5,6	
B620		61 × 299				
B640	<i>Siphoviridae</i>	62 × 305		Lizojenik	4	Transdüksiyon
B653	<i>Siphoviridae</i>	61 × 260	37943	Lizojenik	1/2,4,5,6	
C707	<i>Siphoviridae</i>	60 × 243			5	Lağım suyundan izolasyon
D441	<i>Siphoviridae</i>	63 × 247	~37000	Lizojenik	4,5	
P35	<i>Siphoviridae</i>	58 × 110	35822	Virü lent	1/2	Deney sel olarak gösterilmiş transdüksiyon
P40	<i>Siphoviridae</i>	56 × 108	35638	Virü lent	1/2,4,5,6	
P70	<i>Siphoviridae</i>	(128×57)×141	67170	Virü lent	1/2,4,5,6	
P100	<i>Myoviridae</i>	90 × 198	131384		1/2,4,5,6	
PSA	<i>Siphoviridae</i>	61 × 180	37618	Lizojenik	4	

Tablo 7. Günümüze kadar tanımlanan *Listeria* spesifik fajların özeti (Klumpp ve Loessner 2013).

1.3. Amaç

Günümüzde patojen bakterilerdeki çoklu antibiyotik direnci ve bu mikroorganizmaların neden olduğu infeksiyonların immun sistemi baskılanmış hastalardaki artışı, kritik bir sorun olmaya başlamıştır. Antibiyotiklere dirençli bakterilerin neden olduğu infeksiyonların tedavi maliyetlerinin yüksekliği ve direncin bakteriler arasındaki hızlı yayılımı, antibiyotiklerin etkilerini sınırlamakta ve bazı olgularda da tamamen yetersiz kılabilmektedir. Bakterilerdeki direnç probleminin giderek önem kazanması, anti-bakteriyel modellerin modern tıpta ve biyoteknolojide öncelik kazanmasına neden olmaktadır.

Teknolojinin gelişimiyle birlikte daha hızlı bir yaşam tarzının geliştiği toplumlarda hazır gıda tüketiminin artması, buzdolabı ısısında üreyebilen *Listeria*'lara karşı daha dikkatli ve kontrollü tüketimi gerektirmektedir. Listerial infeksiyonlar, çoğunlukla gıda kaynaklı olması nedeniyle salgınlar şeklinde seyredebilir. İnfekte hayvanlar dışkı, süt, idrar, atık fetus ve uterus akıntıları ile çevreyi ve gıda ürünlerini kontamine edebilmektedir.

Kars Yöresi'nde yapılacak bu çalışmada, halk sağlığı açısından önemi her geçen gün daha fazla fark edilen listeriozise karşı alternatif bir tedavi şekli olabileceği düşünülen faj terapisine katkıda bulunmaya çalışılacak, çevresel örneklerden izole edilecek fajlar tiplendirilerek yöreye özgü fajlar bulunup bulunmadığı araştırılacaktır.

2. MATERYAL-METOT

2.1. MATERYAL

2.1.2. Bakteriyofaj İzolasyonu İçin Örnekler

Bu çalışmada, 21.11.2012 - 28.07.13 tarihleri arasında Kars Merkez' den rastgele-tesadüfi örnekleme ile 15 farklı çevresel odaktan toplam 45 örnek alınarak *L. monocytogenes*'e özgü bakteriyofajı açısından değerlendirilmiştir. Yine aynı tarihler arasında, Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'na getirilen 3 silaj örneği ve *Listeria* yönünden şüpheli görülen 8/13 ve 29/13 numaralarıyla kayıt altına alınan koyun akciğerleri de *Listeria monocytogenes*'e özgü bakteriyofaj açısından incelenmiştir. Çevresel örnekler steril vida kapaklı 50 ml'lik falkon tüplerine yaklaşık 40 ml miktarınca alındı. Alınan çevresel örnekler aynı gün içerisinde incelenmek üzere Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Bakteriyoloji Laboratuvarı'na getirildi. Örnekleme yapıldığı çevresel ortamlar aşağıda (Tablo 8) listelenmiştir.

Tablo 8. Bakteriyofaj açısından değerlendirilen örneklerin toplandıkları yerler.

Örnekleme Yapılan Yer	Örnek Sayısı
KAÜ Merkez Kampüsteki /Dere	3
Kars Merkez/Mezbahane	3
KAÜ Merkez Kampus/Çiftlik	3
Kars Merkez/Peynir Fabrikası	3
Kars Merkez/Dereiçi	3
Kars Merkez/Tavuk Çiftliği	3
Kars Merkez/TEDAŞ Karşısı	3
Kars Merkez/Havaalanı yolu/Mera	3
Kars Merkez/Peynirci(1)	3
Standart Suşlardan	3

Kars Merkez/Kasap	3
KAÜ Merkez Kampüs/Mandıra	3
Kars Merkez/Digor yolu/Mera	3
Kars Merkez/Selim Yolu/ Su Birikintileri	3
Kars Merkez/ Hayvan Pazarı	3
Silaj	3
Laboratuvara getirilen koyun akciğerleri	2
Toplam	50

2.1.3. Standart Bakteri Suşları

Bakteriyofajların konakçı duyarlılıklarının belirlenmesi ve PCR analizlerinin yapılması sırasında kullanılan *L. monocytogenes* ATTC-7644 Etlik Veteriner Kontrol Merkez Araştırma Enstitüsü'nden temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan iki adet *Listeria* spp. bakteri suşu KAÜ Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'na getirilen *Listeria* şüpheli örneklerden izole edilmiştir.

2.1.4. Konakçı Duyarlılık Testi ve *Listeria* Türlerinin İzolasyonu İçin Kullanılan Araç ve Gereçler

L. monocytogenes'e özgü bakteriyofajların izolasyonu için kullanılan besiyerleri ve solüsyonlar, üretici firmanın prosedürleri dikkate alınarak ve bazı modifikasyonlar yapılarak hazırlandı.

***Listeria* enrichment broth base (FDA/Oxoid CM862)**

	<u>gram/litre</u>
Tryptone soya broth	30.0
Yeast extract	6.0
pH	7.3±0.2

Hazırlanması: Materyalde bulunabilecek *Listeria* cinsi bakterilerin zenginleştirmesi dolayısıyla da bakteriyofaj sayısının artırılması amacıyla kullanıldı. Besiyerinden 18 g tartılarak üzerine 500 ml distile su eklendi ve sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi. Daha sonra 50°C'ye kadar soğutuldu ve örneklerde kullanılmak üzere 10'ar ml tüplere dağıtıldı.

***Listeria* selective enrichment supplement (Oxoid SR141)**

	<u>mg/ml</u>
Nalidixic Acid	20.0
Cycloheximide	25.0
Acriflavine Hydrochloride	7.5
Distile su	2

Hazırlanması: Bir şişe içeriği 2 ml steril distile su içerisinde çözülerek, 500 ml'lik brotha ilave edildi.

***Listeria* selective agar base (Oxford Agar/Oxoid CM856)**

	<u>gram/litre</u>
Columbia blood agar base	39.0
Esculin	1.0
Ferric ammonium citrate	0.5
Lithium chloride	15.0
pH	7.0±0.2

Hazırlanması: Besiyerinden 27.75 g tartılarak, üzerine 500 ml distile su eklendi ve sıcak su banyosunda eritildi. Otoklavda 121°C'de 15 dk. steril edildi. Daha sonra 50°C'ye kadar soğutuldu ve selektif supplement (SR140) ilave edilerek petri kutularına dağıtıldıktan sonra kullanılıncaya kadar +4°C'de buzdolabında saklandı.

Listeria selective supplement (Oxoid SR140)

	<u>mg</u>
Cycloheximide	200.0
Colistin sulphate	10.0
Acriflavine	2.5
Cefotetan	1.0
Fosfomicin	5.0

Hazırlanması: Bir şişe içeriği 5 ml steril distile su/etil alkol karışımı içerisinde çözülerek, 500 ml'lik selektif agara ilave edildi.

Brain heart infusion broth (Merck 1.10493)

	<u>g/L</u>
Nutrient Substrat	27,5
D(+) Glukoz	2.0
NaCl	5
Na ₂ HPO ₄	2,5

Hazırlanması: Dehidre besiyeri, 37,0 g/L olacak şekilde damıtık su içinde ısıtılarak eritilip, amaca uygun kaplara (tüp, erlen vb.) dağıtıldı ve otoklavda 121°C'da 15 dk. sterilize edildi.

Mitomisin-C, bakterilerde bulunması muhtemel profajların genomik DNA'dan ayrılarak litik faja dönüşmesi için kullanıldı.

2.1.5. İzole Edilen Fajların PCR Temelli Moleküler Tanısı İçin Kullanılan**Araç ve Gereçler**

DNeasy kan ve doku kiti (Qiagen)

AccuPower® Gold Multiplex PCR PreMix (Bioneer)

Primerler; OPL5 (5-ACGCAGGCAC-3), RAPD5 (5-AACGCGCAAC-3), P1 (5-CCGCAGCCAA-3) ve P2 (5-AACGGGCAGA-3)

2.2. METOT

2.2.2. Örneklerden Faj İzolasyonu

Örneklerden faj izolasyonu için Demirbağ ve Demir'in (Demirbağ ve Demir 2011), bakteriyofaj izolasyon metodu modifiye edilerek kullanılmıştır.

- 45 ml sıvı örnek yada 5 g katı örnek, 5 ml *Listeria* enrichment broth base içine koyularak hafifçe çalkalandı.
- Bu zenginleştirme ortamı 30°C' de 24 saat inkübe edildi.
- Kültürün 10 ml'si bir santrifüj tüpüne aktarıldı ve 2500 rpm'de 10 dk. santrifüj edilerek katı maddeler uzaklaştırıldı.
- Elde edilen süpernatant 0.22 µm por çaplı membran filtreden süzülerek kapaklı steril tüplere alındı.

2.2.3. Mitomisin-C ile Faj İzolasyonu

- BHI brothta besiyerinde hazırlanan bir gecelik bakteri kültüründen 1:100'lük dilüsyon hazırlandı.
- Mitomisin-C distile su ile 2 mg/ml oranında çözdürüldü.
- Hazırlanan bakteri kültürüne, 1µl/ml oranında mitomisin-C ilave edildi.
- Kültür, 6 saatlik inkübasyona bırakıldı.
- 6 saat sonra mitomisin-C bulunan kültür 15 dk., 2500 rpm'de santrifüj edildi.
- Süpernatant 0.22 µm por çaplı membran filtreden süzüldü (Loessner ve ark. 1991)

2.2.4. İzole Edilen Bakteriyofajların Titrasyonu

- Bakteriyofajların titrasyonu için öncelikle 10 ml BHI broth ve 100 µl *L. monocytogenes* ile hazırlanan kültür, 3 saat, 30°C'de inkübe edilerek logaritmik faz hazırlandı.
- Titrasyon için eşit miktarlarda logaritmik faz ve izole edilen faj 1 gece boyunca 30 °C'de inkübe edilip, 0.22 µm'lik membran filtreden süzüldü (Prof. Dr. Les Baillie, Cardiff Üniversitesi)

2.2.5. Konakçı duyarlılığı testi

Örneklerden direkt olarak izole ettiğimizi düşündüğümüz litik fajların veya mitomisin-C kullanılarak elde ettiğimizi düşündüğümüz lizojenik fajların etkinliğini gözlemleyebilmek için, *Listeria* selective supplement içeren *Listeria* selektive agar base üzerine standart suşlar yayma ekim yöntemiyle ekildi. Ekimden hemen sonra, örneklerden elde edilen ve bakteriyofaj içerip içermediğini test edeceğimiz izolatlardan petri kutusunun birkaç yerine yaklaşık 15'er µl damlatıldı ve 30°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı.

2.2.6. Bakteriyofajlardan DNA İzolasyonu

DNeasy kan ve doku kiti ile DNA izolasyonu

- 1'er ml miktarında faj örneği 1,5 ml'lik ependorflara aktarıldı ve 12.100 rpm'de 60 dk. santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve dipte kalan tortu kullanıldı.
- Tortuya 20 µl proteinaz-K eklenip 15 saniye vortekslendi.
- Ependorfa 180 µl ATL buffer eklenip, 15 sn. vortekslendikten sonra 56 °C'de 10 dk. blok ısıtıcıda bekletildi.
- Ependorfa 200 µl AL buffer eklenip, 15 sn. vortekslendikten sonra 56°C'de 10 dk. blok ısıtıcıda bekletildi.
- Ependorfa 200 µl %96-100'lük etanol eklenerek 15 sn. vortekslendi. Vortekslemenin ardından pikofüj ile santrifüj edilerek kapak ve kenarlardaki sıvının tüpün dibine inmesi sağlandı.

- Dikkatli bir şekilde ependorftaki karışım alınarak 2 ml'lik QIAamp mini spin column toplama tüpüne aktarıldı. Aktarma işlemi yapılırken toplama tüplerinin kenarları ıslatılmadan aktarım gerçekleştirildi. Toplama tüpleri 6.000 x g' de 1 dk. santrifüj edildi ve santrifüj sonunda 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne aktarılıp, filtratı içeren toplama tüpü atıldı.
- Dikkatli bir şekilde QIAamp mini spin column açılarak 500 µl AW1 eklendi. QIAamp mini spin column 6.000 x g de 1 dk santrifüj edildi ve santrifüj sonunda 2 ml'lik yeni bir toplama tüpüne aktarılıp filtratı içeren toplama tüpü atıldı.
- QIAamp mini spin column açılarak kenarlara bulaştırmamaya dikkat ederek 500 µl AW2 eklendi. QIAamp mini spin kolon 14.000 rpm' de 3 dk santrifüj edildi ve santrifüj sonunda yeni bir 1,5 ml'lik ependofa yerleştirilip, filtratı içeren toplama tüpü atıldı.
- 1,5 ml'lik ependorfa yerleştirilen QIAamp mini spin kolon kapağı dikkatli bir şekilde açılarak 200 µl AE buffer ilave edilerek oda ısısında 1 dk. bekletildikten sonra 6.000 x g de 1 dk. santrifüj edildi.
- Daha konsantre DNA elde edebilmek için 10. basamaktaki işlemler tekrarlandı.
- Santrifüj sonunda 1,5 ml'lik ependorf tüplerinde ekstraksiyon sonucu elde edilen DNA kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

RAPD-PCR

AccuPower® Gold Multiplex PCR PreMix kullanılarak ve ticari kitte belirtilen aşağıdaki protokol modifiye edilerek PCR yapıldı.

- Kalıp DNA, distile su ve primerler kullanılmadan önce oda ısısında çözdürüldü.
- DNA ve primerler AccuPower Gold Multiplex PCR PreMix tüplerine eklendi.

Bileşenler	Miktarlar
Template DNA	1 ng-100 ng
Primer set	1-5 pmoles

- Total volume 20 µl olana kadar AccuPower Gold Multiplex PCR PreMix tüplerine distile su eklendi.

- Liyofilize yeşil pellet tamamen çözdürüldü ve santrifüjle tüpün aşağısına toplanması sağlandı.

- Reaksiyon aşağıdaki şartlarda gerçekleştirildi;

Aşama	Sıcaklık	Zaman	Siklus sayısı
Ön-Denatürasyon	95°C	5 dk	25-35
Denatürasyon	95°C	30 sn	
Annealing	55–65°C	30-60 sn	
Ekstensiyon	72°C	1dk/kb	
Final Ekstensiyon	72°C	5 dk	

- 6. 5 µl reaksiyon karışımı agaroz jele yükleme boyasıyla karıştırılmadan yüklendi.

PCR Ürünlerinin Elektroforezi

PCR'da amplifiye edilen gen bölgelerinin uzunluğunu saptamak amacıyla agaroz jelde koşturuldu. Jelin hazırlanmasında ve tank tamponu olarak 1xTBE (Tris-Borik Asit-EDTA) kullanıldı. Agaroz jel (% 1'lik) için, 40 ml 1xTBE içeren bir balon jöle içerisine 0.4 g agaroz (Prona Basica Le, PL 100 g) tartılarak ilave edildi. Mikrodalga fırında homojen hale gelinceye dek ısıtıldı ve buhar çıkması durduktan sonra etidyum bromidten 4 µl eklendi. Hava kabarcığı oluşmayacak şekilde yavaşça karıştırıldıktan sonra içerisine tarak

yerleştirilmiş olan elektroforez jel küvetine döküldü. 20-25 dk beklenecek jelin donması sağlandı. Bu sırada etidyum bromidin aktivitesini yitirmemesi için hazırlanan jel gün ışığından korundu. Donan jelden taraklar dikkatlice çıkarılarak içerisinde 1xTBE tamponu bulunan elektroforez tankının içine yerleştirildi. 6.5 µl reaksiyon karışımı agaroz jele yükleme boyasıyla karıştırılmadan yüklendi. Elektroforez jel düzeneği 80 volta ayarlanarak 1 saat yürütüldü. DNA fragman büyüklükleri UV illuminatörde (UVP/LMS-20E) görüntülendi.

3. BULGULAR

3.1. İzolasyon Bulguları

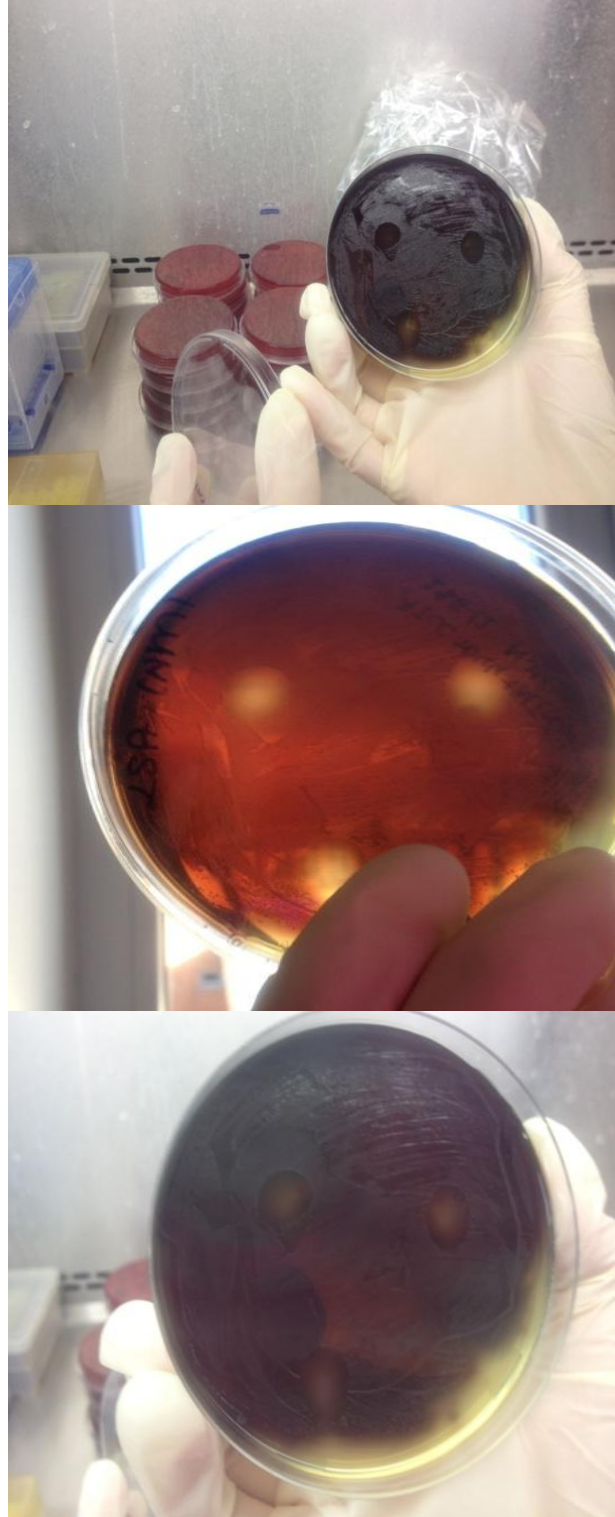
Toplam 50 örnekten 12 adetinde *L. monocytogenes* ATTC 7644 ve laboratuvarında izole edilen *Listeria* spp.'ler üzerine etki eden bakteriyofajlar elde edildi. Aşağıdaki tabloda hangi örneklerden faj izole edildiği belirtilmiştir (Tablo 9).

Tablo 9. Bakteriyofaj izole edilen örnekler.

Pozitif Örnek Numaraları	Örnekler	Faj İzolasyon Bulgusu	İzolasyon Yöntemi	Konakçı Etkinliği
1	KAÜ Merkez Kampüs /Dere	+	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
2	Kars Merkez/Mezbanane	+	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
3	KAÜ Merkez Kampüs/Çiftlik	+	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
4	Kars Merkez/Peynir Fabrikası	+	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
5	Kars Merkez/Dereiçi	+	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644

6	Kars Merkez/Tavuk Çiftliği	+	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
7	Kars Merkez/Tedaş Karşısı	+	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
	Kars Merkez/Havaalanı yolu/Mera	-	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
8	Kars Merkez/Peynirci(1)	+	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
9	Standart Suşlardan	+	Mitomisin-C kullanarak	ATTC 7644
	Kars Merkez/Kasap	-	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
10	KAÜ Merkez Kampüs/Mandra	+	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
	Kars Merkez/Digor Yolu/Mera	-	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
	Kars Merkez/Selim Yolu/ Su Birikintileri	-	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
	Kars Merkez/ Hayvan Pazarı	-	Standart suş kullanmadan	ATTC 7644
	Silaj	-	Standart suş kullanmadan/Mitomisin-C ile	ATTC 7644
11, 12	Laboratuvara getirilen koyun akciğerleri (2 adet)	++	Standart suş kullanmadan	Örneklerden izole edilen <i>Listeria</i> spp.'ler üzerine.
	Toplam		12	

Bakteriyofajların, *Listeria* spp.'ler üzerine damlatılarak bir gece boyunca 30 °C'de inkübasyonları sonrasında, pozitif sonuçların plak görünümleri aşağıdaki gibidir (Resim 7).

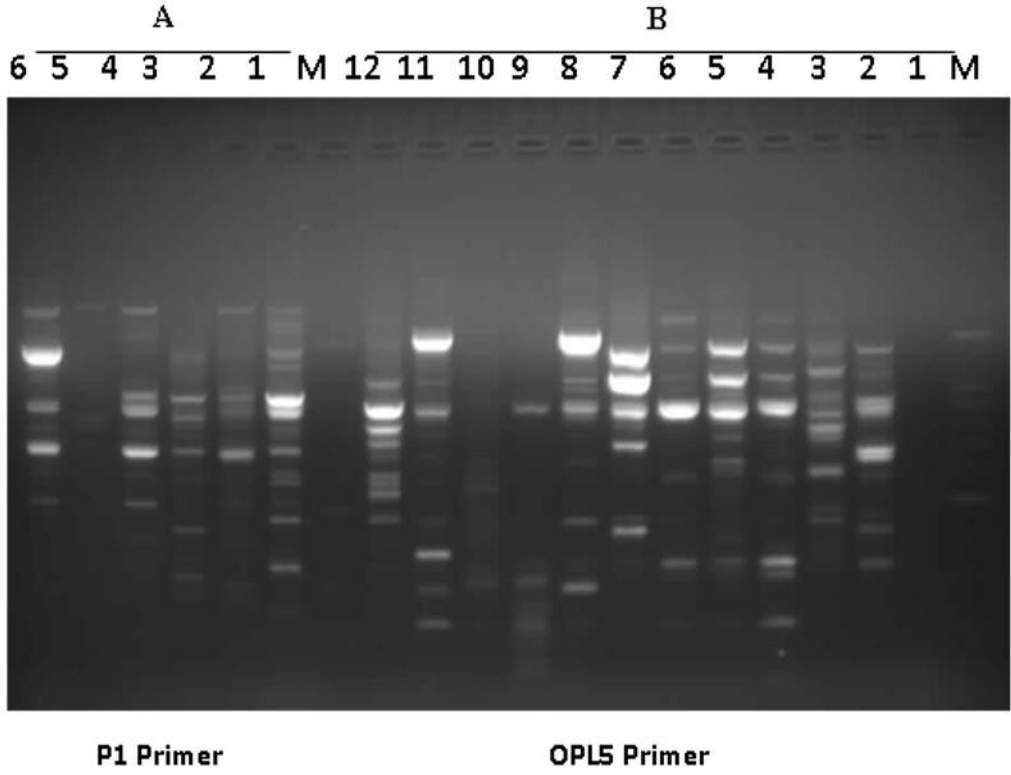


Resim 7. Bakteriyofaj plak görünümleri.

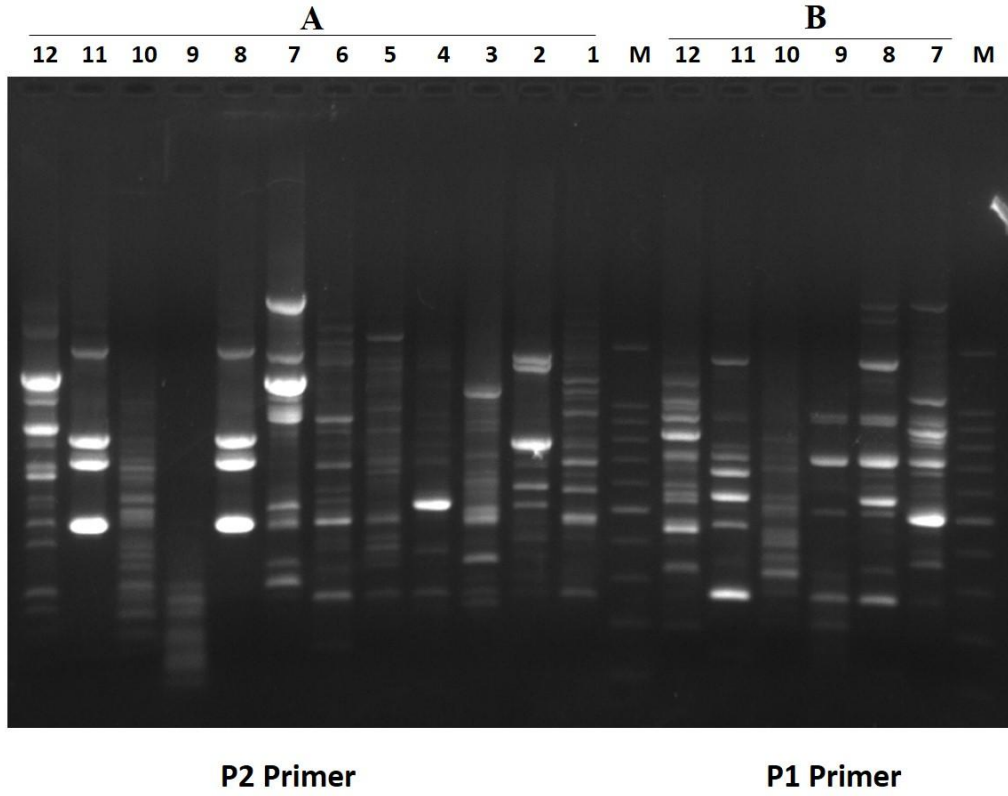
3.2. Genotipik Karakterizasyon Bulguları

3.2.2. RAPD-PCR Bulguları

Çalışmada kullanılan 12 adet bakteriyofajın deneysel olarak tanımlanması için, RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır. Kalıp DNA olarak daha önceden bakteriyofajlardan üretilen genomik DNA'lar kullanılmıştır. PCR sonucu elde edilen veriler Resim 8-10'da gösterilmiştir. Resim 8 OPL5 ve P1 primerleri kullanılarak elde edilen agaroz jel görüntüsünü içermektedir. Resim 9'da P2 ve P1, Resim 10'da ise RAPD5 primerleri kullanılarak elde edilen agaroz jel görüntüleri gösterilmiştir. Yapılan bu çalışmada, PCR sonuçlarına göre, 2,4 ve 9 nolu örneklerin faj tiplendirilmesi sırasıyla vB_SauS-philPLA35, vB_SepiS-philPLA7 ve ΦH5 olarak tanımlanmıştır. 12 ile 7, 11 ile 8 ve 1,3,5 ile 10'un aynı jel görüntüsüne sahip olması nedeniyle aynı türler olabilecekleri düşünülmüştür. Ancak, yapılan literatür taramasına göre bu primerler kullanılarak elde edilen aynı jel görüntüsüne sahip örneklere rastlanmamıştır.



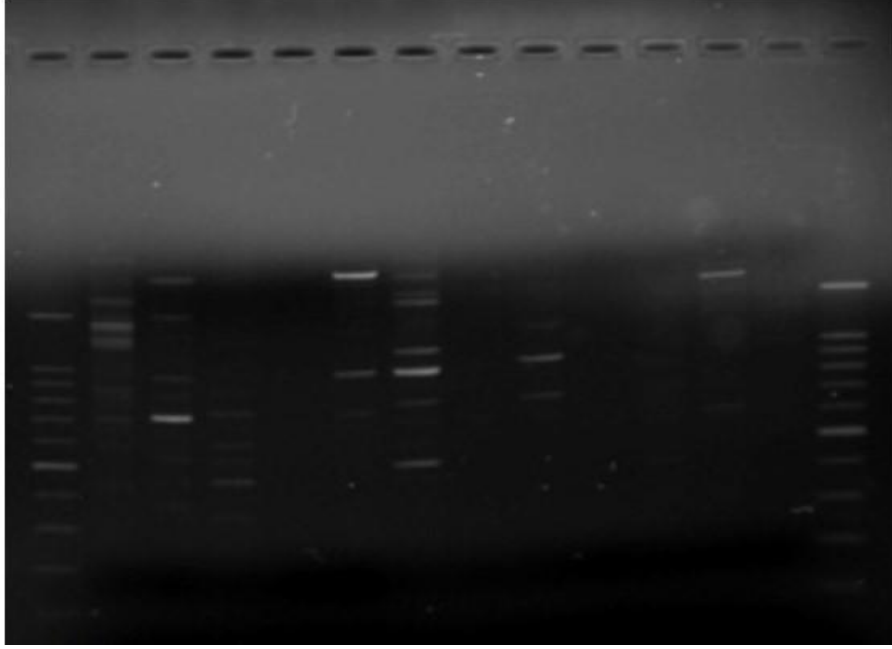
Resim 8. OPL5 ve P1 primeri kullanılarak elde edilen PCR'ın agaroz jel görüntüsü. **A)** P1 primeri kullanılarak elde edilen 6 örneğin PCR görüntüsü. **B)** OPL5 primeri kullanılarak elde edilen örneklerin PCR görüntüsü (% 0.8'lik agaroz jel'e 100 bp marker ile birlikte yüklenmiş ve 80 V'da 60 dk yürütülmüştür).



Resim 9. P2 ve P1 primerleri kullanılarak elde edilen PCR'ın agaroz jel görüntüsü. **A)** P2 primeri kullanılarak elde edilen örneklerin PCR görüntüsü. **B)** P1 primeri kullanılarak elde edilen 6 örneğin PCR görüntüsü. (% 0.8'lik agaroz jele 100 bp marker ile birlikte yüklenmiş ve 80 V'da 60 dk yürütülmüştür).

RAPD5 Primer

M 12 11 10 9 8 7 6 5 4 3 2 1 M



Resim 10. RAPD5 primeri kullanılarak elde edilen PCR'in agaroz jel görüntüsü. RAPD5 primeri kullanılarak elde edilen örneklerin PCR görüntüsü. (% 0.8'lik agaroz jele 100 bp marker ile birlikte yüklenmiş ve 80 V'da 60 dk yürütülmüştür).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

L. monocytogenes'e spesifik bakteriyofajların izolasyonlarının ilk olarak kaydedildiği tarihler, 1940lar ve 1960'lardır (Jasinska 1964). Günümüze kadar 500'ün üzerinde *Listeria* fajı izole edilmiş, bazıları faj tiplendirme çalışmaları sırasında sınırlı ölçüde karakterize edilmiştir. Bu zamana kadar bulunan *Listeria* spesifik fajlar *Caudovirales* takımına ait, genellikle *Siphoviridae* ya da *Myoviridae* familyasındandır (Loessner ve ark. 2000). Bakteriyofajlara, başlıca *Listeria* türleri ve serovarlarında rastlanırken, daha nadir görülen türlerden *L. grayii* ve yeni tanımlanan *L. rocourtii* ve *L. marthi* ile serovar 3 suşlarında rastlanmamıştır. Serovar 3 suşları bakteriyofaj infeksiyonuna dirençliken, serovar 4 suşlarının oldukça duyarlı oldukları yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Serovar 4b ve 4c suşlarının bakteriyofajlara duyarlı olduğu halde profaj taşımadıkları, bunun hücre duvarlarındaki teikoik asit yapısının farklılığından kaynaklandığı ileri sürülmüştür (Kuenne ve ark. 2013). Yine *L. ivanovii* subsp *ivanovii*'de bakteriyofaj infeksiyonlarına oldukça duyarlı olmasına rağmen, profaja rastlanmamıştır (Loessner ve Rees 2005).

Listeria spesifik fajlar ilk olarak günümüzden yaklaşık 70 yıl öncesinde tanımlanmıştır. O tarihten günümüze kadar *L. monocytogenes* bakteriyofajlarının tanımlanmasında kullanılan çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Ancak tiplendirme metodlarının gelişmesini ve gelişmiş sonuçların alınmasını sağlamak için standardize edilmiş metotlar yeterli değildir (Loessner ve Busse 1990).

Birçok *Listeria* fajı elektron mikroskopik olarak ve protein profilleri yönünden incelenmesine rağmen, genomları ile ilgili çok fazla çalışma bulunmamaktadır. (Zink ve Loessner 1992). Günümüze kadar, lizojenik olan ve *Siphoviridae* familyasına ait PSA ve A118 fajlarının genomları sekanslanmış ve analiz edilmiştir (Loessner ve ark. 2000, Zimmer ve ark. 2003). *Listeria* fajlarıyla ilgili günümüzde yapılan tüm genomu sekanslama

çalışmasının virulent Miyovirus ve geniş konakçı tercih aralığı gösteren P100 fajıyla ilgili olduğu kaydedilmiştir (Carlton ve ark. 2005).

Listeria fajlarının kanalizasyon kanalları, silaj ve gıda üretim ortamları gibi kaynaklardan ve lizojenik suşlardan izole edilebileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (Loessner ve Busse 1990, Hodgson 2000, Kim ve ark. 2008). Yaklaşık 500 listeriafajı izole edilmiş, bazı fajların farklı türleri infekte edebilme özelliği olduğu belirlenmiştir. Bu çalışmalar bize *Listeria* fajları arasında oldukça geniş bir çeşitlilik olduğunu göstermektedir (Hagens ve Loessner 2014).

Tanımlanmış olan bakteriyofajların çoğu, ılımlı (lizojenik) fajlar olup, konakçı genomuna integre olmuş durumdadır. Diğer bakterilerde olduğu gibi, UV ışığı ve mitomisin-C gibi, DNA hasarına neden olan ajanlarla, litik döngü indüklenebilmekte ve infektif fajların oluşmasına neden olabilmektedir (Loessner 1991).

İzole edilen *Listeria* spesifik fajlar genellikle bakteriyi tiplendirme amacıyla kullanılmaktadır. Bu yöntem oldukça ucuz, basit ve hızlıdır. Bakteriyofajlar aynı zamanda bir suştan başka bir suşa genetik özellik transferinde de kullanılabilir. Bu çalışmalar genetik manipülasyon ve fenotip çalışmalarına imkan tanımaktadır. Lauer ve ark. (2002)'nin yaptıkları çalışmalarda, *E. coli* ve *Listeria* arasında transfer yapabilen, *Listeria* genomuna transformasyondan sonra integre olabilen fajların olduğunu ifade etmişlerdir.

Loessner ve Busse (1990) yaptıkları çalışmada, süt ürünleri ve çeşitli gıdalardan izole edilmiş ve tanımlanmış 57 *Listeria* suşu üzerinde 16 faj izolatu kullanarak tiplendirme yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada 100X rutin faj test dilüsyonu ile tiplendirmede %84,5 oranında başarı elde etmişler ve tiplendirmenin birkaç hafta sonra bile tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğunu ortaya koymuşlardır. Yine bu çalışmada serovar 3, *L. grayi* ve *L. murrayi*'nin lizise karşı dirençli olduklarını ortaya koymuşlardır.

Kim ve ark. (2008)'nin yaptığı çalışmada, Amerika Birleşik Devletlerinde, 4 ayrı hindi üretim tesisinden *L. monocytogenes*'e özgü faj izolasyonu denenmiştir. Alınan bu çevresel örnekler aynı zamanda *Listeria* spp. izolasyonu için de kullanılmıştır. Toplamda 12 faj izole edilmiş ve bunlar konakçı spektrumlarına göre 3 farklı gruba ayrılmıştır. İlk gruba giren 9 bakteriyofajın, çeşitli *L. monocytogenes* serotiplerini ve *Listeria* türlerini (*L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* ve *L. ivanovii*) infekte edebildiği görülmüştür. Geriye kalan fajların daha dar spektrumlu oldukları gözlemlenmiştir. İzole edilen *Listeria* türlerinden faj dirençli olan 2 suşla yapılan çalışma sonucunda, fajların konakçı üzerine adsorbsiyonunun oldukça az sayıda olduğu görülmüştür.

Arachchi ve ark. (2014) yaptıkları çalışmada, daha önce deniz ürünlerinden izole edilen *Listeria* türlerinin, araştırılmamış olan bakteriyofajlara karşı duyarlılıklarını incelemişlerdir. Çalışmada deniz ürünlerinden izole edilmiş *Listeria* türleri üzerine 3 farklı bakteriyofaj etkinliği, litik zonların şekline ve plaklara bakılarak değerlendirilmiştir. Çalışmada FWLLm1, FWLLm3 ve FWLLm5 fajları kullanılmıştır. Toplam 50 adet *Listeria* suşu üzerindeki denemelerde, 42 suşun fajlara duyarlı olduğu gösterilmiştir. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada deniz ürünlerinden izole edilen bakteriyofajların *Listeria* suşları üzerine etkilerini araştırmışlar, bakteriyofajların oldukça geniş konakçı spektrumuna sahip olduklarını bildirmişlerdir. Çalışmada, deniz ürünlerindeki *Listeria* kontaminasyonunda, bakteriyofajların koruyucu olarak kullanılabilirliklerini önerilmiştir (Arachchi ve ark. 2013).

Vongkamjan ve ark. (2012), yaptıkları çalışmada iki ayrı işletmeden aldıkları silajlardan bakteriyofaj ve *L. monocytogenes* izolasyonu yapmışlardır. Örneklerin %4,5'inin *L. monocytogenes* yönünden, %47,8'inin listeriafaj yönünden pozitif olduğunu görmüşlerdir. Toplam 13 referans *L. monocytogenes* suşu üzerindeki faj etkinliği denemelerinde

fajların geniş spektruma sahip olduklarını ancak *L. monocytogenes* 3c serotipinin fajlara dirençli olduğunu kaydetmişlerdir.

Diana Guti rrez ve ark. (2011) yaptıkları çalışmada, farklı genetik özelliklere sahip fajlardan oluşan kokteyllerin faj terapisinde daha etkili olduğunu ileri s rmuşlerdir. Yapılan bu çalışmada *Staphylococcus aureus*, *Lactococcus lactis*, *E. coli*, *Streptococcus thermophilus*, *Bacillus subtilis* ve *Lactobacillus casei* bakteri suşlarını infekte edebilen 26 farklı bakteriyofaj, RAPD-PCR tekniği ile elde edilen bant patternleri açısından değerlendirilmiştir. Çalışmada OPL5 (5-ACGCAGGCAC-3), RAPD5 (5-AACGCGCAAC-3), P1 (5-CCGCAGCCAA-3) ve P2 (5-AACGGGCAGA-3) primerleri kullanılmıştır. Elde ettikleri bant padderlerinden RAPD-PCR ile elde edilmiş bant patternlerinin bakteriyofaj tiplendirmede kolay ve tekrarlanabilir bir metod olduğunu göstermişlerdir.

Yaptığımız çalışmada izole ettiğimiz 12 bakteriyofajın deneysel olarak tanımlanması için, RAPD-PCR yöntemi kullanılmıştır. Bu çalışmada kullanılan primerler, Guti rrez ve arkadaşlarının çalışmalarında kullandıkları rastgele primerlerdir (Guti rrez ve ark. 2011).

Yaptığımız alışmada PCR sonuçlarına göre, 3 bakteriyofaj vB_ _SauS-philPLA35, vB_SepiS-philPLA7 ve ΦH5 olarak tanımlanmıştır. 7, 11, 12 ile 1, 3, 5 ve 8 ile 10 numaralı örneklerin aynı jel görüntüsüne sahip olması dolayısıyla aynı türler olabilecekleri d ş n lmektedir. Ancak yapılan literatür taramasına göre bu primerler kullanılarak elde edilen aynı jel görüntüsüne sahip örnekler rastlanmamıştır. Elde ettiğimiz bu sonuçlar Guti rrez ve ark. (2011)'nin yaptıkları çalışmada önerdikleri "bakteriyofaj kokteyllinin terapide daha etkili olabileceği" tezini desteklemektedir. Elde ettiğimiz bant patternlerine bakıldığında, tanımlanabilen bakteriyofajlardan vB_SepiS-philPLA7'nin *S. epidermidis*, vB_SauS-philPLA35 ve ΦH5'in *S. auerus*  zerine etkili oldukları daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Bakteriyofajların cinse spesifik olduğunu bilgisinden yola çıkarak, çevresel örneklerden izole edilen faj süspansiyonu içinde farklı bakteriyofaj

türlerinin bulunabileceği ve bu karışımın (bakteriyofaj kokteylinin) farklı türler üzerine etkili olabileceği düşünüldü. Kullanılan primerler ile varlığını gösterebildiğimiz bu bakteriyofajlar dışında başka tür bakteriyofajların varlığı, yine çeşitli primerler ile gösterilebilecektir.

Taradığımız literatürler içinde, hangi bakteriyofaj türüne ait olduğunu tespit edemediğimiz fakat aynı bant patternine sahip bakteriyofajlar gözlemledik. Bunlardan 5 tanesinin (1, 3, 5, 8 ve 10) ve diğer 3 tanesinin (7, 11 ve 12) aynı bant görüntülerine sahip olduklarını belirlendi. Elde edilen bu bantların sekanslaması yapılarak, kayıtlı bulunan bakteriyofaj genom sekansı ile karşılaştırılarak hangi bakteriyofaj türü olduğu yapılacak çalışmalarda anlaşılabilir, böylece aynı bakteriyofajın RAPD-PCR bant patterni de yaptığımız çalışmayla belirlenmiş olacaktır.

Literatür taramalarımızda Kars bölgesinde daha önce *Listeria* türlerine özgü faj çalışmaları yapılmadığı görülmüştür. Bu nedenle bu yörede üretilecek olan silajlar, hayvansal gıdaların dekontaminasyonu vb. amaçlar için çalışmamızın yol gösterici olabileceğini düşünmekteyiz.

5. ÖZET

Listeriozis ruminantlılarda abortus, ensefalomyelitis ve septisemi ile seyrederek, önemli ekonomik kayıplara yol açan zoonoz bir enfeksiyondur. *Listeria*'ların doğal rezervuarlarının toprak ve memelilerin sindirim sistemi olması, *Listeria*'lar ile gıdaların kontaminasyon ihtimalini artırmaktadır. Teknolojinin gelişimiyle birlikte daha hızlı bir yaşam tarzının benimsendiği toplumlarda hazır gıda tüketiminin artması, buzdolabı ısısında üreyebilen *Listeria*'lara karşı daha dikkatli ve kontrollü tüketimi gerektirmektedir.

Bu çalışmada, Kars merkezde bulunan bazı ticari işletmelerden ve çevresel odaklardan toplam 45 örnek toplandı. Örneklerin toplanırken kirli alanlar, lağım sularının karıştığı alanlar ve kanatlı hayvanların temas ettiği çevresel örnekler tercih edildi. Yine Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Mikrobiyoloji ABD Laboratuvarına getirilen 3 silaj örneği ve *Listeria* şüpheli 2 örnek değerlendirmeye alındı. Toplamda 50 örnekten litik faj izolasyonu ve mitomisin-C ile lizojenik faj izolasyonu gerçekleştirildi. Bu örneklerin 12 tanesinden 1 adetinden lizojenik, 11 adetinden ise litik faj izolasyonu yapıldı. İzolasyon, plak görünümleriyle doğrulandı.

İzolasyonu yapılan bakteriyofajları genotipik olarak tiplendirilmek için RAPD-PCR yöntemi kullanıldı. DNA'ların agaroz jel görüntülerinde 3 fajın daha önceki çalışmalarda tespit edilmiş vB_SepiS-philPLA7, vB_SauS-philPLA35 ve ΦH5 oldukları görüldü. Geriye kalan 9 fajın bant profilleri karşılaştırıldığında, 3 fajın bant profillerinin ve diğer 5 fajın bant profillerinin aynı oldukları görüldü.

Listeria enfeksiyonlarının hayvan ve insan sağlığı açısından önemli ve ekonomik kayıplara sebep olduğu düşünüldüğünde, mevcut çalışmanın yörede üretilecek olan silajların, hayvansal gıdaların dekontaminasyonu ve diğer amaçlar için yol gösterici olabileceği kanısına varıldı.

6. SUMMARY

Listeriosis is a zoonotic infection, causes abortion, encephalomyelitis and septicaemia in ruminants, leading to significant economic loss. The fact that soil and the digestive systems of mammals are the natural reservoirs for *Listeria* spp. increases the likelihood that food contamination will occur. In developed societies, the faster pace of life and technological advances have resulted in increased consumption of processed foods, making it necessary to take more precautions against *Listeria* spp., which propagate even under refrigeration.

In this study, 45 samples were collected from some commercial businesses and environmental focus located in Kars center. Dirty areas, the area in contact with the mix of sewage and poultry environmental were preferred while collecting samples. Again, 3 silage samples and two samples were suspicious of *Listeria* were evaluated that brought to Kafkas University, Faculty of Veterinary Microbiology Laboratory. Isolation of lytic phage and lysogenic phage with mitomycin-C from total of 50 samples was performed. From 1 out of 12 of these samples lysogenic, from the remaining 11 samples lytic phage isolation were made. Isolation was confirmed by plaque view.

RAPD-PCR method was used to genotyping of bacteriophages that were isolated. The agarose gel images of 3 phages view were observed to have been determined as previous study vB_SepiS-phiIPLA7, vB_SauS-phiIPLA35 and Φ H5. When band profiles belong to remaining 9 phages were compared, band profiles of 3 phages and the other 5 phages band profiles evaluated to be the same with each other.

This study is thought to be precursors for purposes such as the decontamination of silage will be produced in the region and animal food, since *Listeria* infections are important for animal and human health and cause considerable economic losses.

7. KAYNAKLAR

1. Abedon S.T., Kuhl S.J., Blasdel B.G., Kutter E.M.: Phage treatment of human infections, *Bacteriophage* 1:2, 66-85. 2011.
2. Ackermann H.W.: Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol* 154, 245-251. 2003.
3. Ackermann H.W.: Bacteriophage taxonomy in 1987. *Microbiol. Sci.*, 4; 214-218. 1987.
4. Akça D., Şahin M.: Kars yöresi sığırlarından alınan süt ve vajinal sıvap örneklerinden *Listeria* türlerinin araştırılması, *Kafkas Univ. Vet. Fak. Derg.*, 17 (6): 987-993. 2011.
5. Akça D.: Kars yöresi sığırlarından alınan süt ve vajinal sıvap örneklerinden *Listeria* türlerinin araştırılması, *Kafkas Univ. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Doktora tezi*. 2010.
6. Arachchi G.J., Cruz C.D., Dias-Wanigasekera B.M., McIntyre L., Billington C., Hudson A., Flint S.H., Mutukumira A.N.: Host range and in vitro lysis of *Listeria monocytogenes* seafood isolates by bacteriophages., *Food Sci Technol Int.* 20(8):591-603. 2014.
7. Arachchi G.J., Mutukumira A.N., Dias-Wanigasekera B.M., Cruz C.D., McIntyre L., Young J., Flint S.H., Hudson A., Billington C.: Characteristics of three listeriaphages isolated from New Zealand seafood environments. *J Appl Microbiol.* 115(6):1427-38. 2013.
8. Arda M, Minbay A., Leloğlu N, Aydın N., Karaman M., Akay Ö., Ilgaz A., İzgür M., Diker K.S; Özel mikrobiyoloji 4. Baskı Medisan Ankara. 1997.
9. Arda M., Minbay A., Leloğlu N., Aydın N., Kahraman M., Akay Ö., Ilgaz A., İzgür M. ve Diker K. S.: Özel mikrobiyoloji ders kitabı. 5. baskı, Medisan yayınları, Ankara, S: 147-155. 1999.
10. Arda M.: Temel mikrobiyoloji ders kitabı. 2. Baskı, Medisan yayınları, Ankara. 2000.
11. Atterbury R.J., Van Bergen M.A.P., Ortiz F., Lovell M.A., Harris J.A., De boer A., Wagenaar J.A., Allen V.M., Barrow P.A.: Bacteriophage therapy to reduce *Salmonella* colonization of broiler chickens. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 4543-4549. 2007.

12. Barrow P.A., Soothill J.S.: Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol* 5:268-71. 1997.
13. Bhunia A.K.: Antibodies to *Listeria monocytogenes*. *Crit. Rev. Microbiol.* 23(2):77-107. 1997.
14. Bielecki J.: Bacterial determinants of intracellular growth of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol Pol.* 40(3/4):131-136. 1991.
15. Boyd E. F., Brüssow H.: Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved, *Trends in Microbiology* Vol.10 No.11. 2002.
16. Breed R.S., Murray E.G.D., Smith N.R.: *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 7, The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 1957.
17. Briers Y., Klumpp J., Schuppler M., Loessner M.J.: Genome sequence of *Listeria monocytogenes* Scott A, a clinical isolate from a food-borne listeriosis outbreak. *J Bacteriol* 193:4284-5. 2011.
18. Bruynoghe R., Maisin J.: Essais de thérapeutique au moyen du bacteriophage. *C. R. Soc. Biol.* 85:1120–1121. 1921.
19. Bubert A., Hein I., Rauch M., Lehner A., Yoon B., Goebel W. and Wagner M.: Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based on multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(10), 4688-4692. 1999.
20. Bubert A., Köhler S. and Goebel W.: The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(8), 2625-2632. 1992.
21. Cain D.B., ve McCann V.L.: An unusual case of cutaneous listeriosis. *J. Clin. Microbiol.* 23:976-977. 1986.
22. Carlton R.M., Noordman W.H., Biswas B., de Meester E.D., Loessner M.J.: Bacteriophage P100 for control of *Listeria monocytogenes* in foods: genome sequence, bioinformatic analyses, oral toxicity study, and application. *Regul Toxicol Pharmacol* 43, 301-312. 2005.

23. Chakraborty T., Goebel W.: Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes*. *Curr. Top. Microbiol.* 138:41-58. 1988.
24. Chkonia I.: Antibacterial-antifungal natural composite for dental use, Bacteriophages and probiotics- Alternative to antibiotics congress, July 1-4, Tbilisi, Georgia. 2012.
25. Cooper C.: Controlled delivery of bacterial viruses for the eradication of bacterial infection, Doktora Tezi, Cardiff University, Cardiff, UK. 2011.
26. Cossart P., Lecuit M.: Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *EMBO J.* 17(14):3797-3806. 1998.
27. Cossart P., and Mengaud J.: *Listeria monocytogenes*-a model system for the molecular study of intracellular parasites. *Mol. Biol. Med.* 6:463-474. 1989.
28. Cossart P., Pizarro-Cerda J., Lecuit M.: Invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*: Functional mimicry to subvert cellular functions. *TRENDS Cell. Biol.* 13(1):23-31. 2003.
29. Cotter P.D., Hill C.: Surviving the acid test: Responses of Gram-positive bacteria to low pH. *Microbiol. Mol. Biol. R.* 67(3):429-453. 2003.
30. Demirbağ Z., Demir İ.: Genel Mikrobiyoloji Laboratuvarı Ders Kitabı, 4. Baskı, Trabzon. 2011.
31. Diker K.S.: İmmunoloji. Medisan yayınevi 1.Baskı, Ankara. 1998.
32. Disson O., Lecuit M.: Targeting of the central nervous system by *Listeria monocytogenes*, *Virulence* 3:2, 213–221. 2012.
33. Donjacour A., Paros M.: Bacteriophage prevention and therapy for coliform mastitis, Bacteriophages and probiotics- Alternative to antibiotics congress, Tbilisi, Georgia. 2012.
34. Donnelly C. W. and Baigent G. J.: Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 52(4), 689-695. 1986.
35. Dorscht J., Comparative genomics of *Listeria* bacteriophages, Doktora Tezi, Technische Universität München, Münih, Almanya. 2007.

36. Dramsi S., Lebrun M., Cossart P.: Molecular and genetic determinants involved in invasion of mammalian cells by *Listeria monocytogenes*. *Curr. Top. Microbiol.* 209:61-77. 1996.
37. Drevets D.A., Leenen P.J.M., Greenfield R.A.: Invasion of the central nervous system by intracellular bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 17(2):323-347. 2004.
38. Eaton M.D., Bayne-Jones S.: Bacteriophage therapy: Review of the principles and results of the use of bacteriophage in the treatment of infections (I). *J Am Med Assoc* 103:1769-76. 1934.
39. Edelson B.T., Unanue E.R.: Immunity to *Listeria* Infection. *Curr. Opin. Immunol.* 12:425-431. 2000.
40. Endersen E.: Isolation and characterization of six novel mycobacteriophages and investigation of their antimicrobial potential in milk, Bacteriophages and Probiotics- Alternative to antibiotics congress, Tbilisi, Georgia. 2012.
41. Erdoğan H. M.: An epidemiological study of listeriosis in dairy cattle. PhD Thesis, Bristol University, Bristol, U.K. 1998
42. Erdoğan H.M., Gökçe G., Gökçe H. İ., Kırmızıgül A. H., Güneş V., Sural E. ve Yılmaz K.: Kars Yöresi'ndeki sığırlarda *Listeria monocytogenes* infeksiyonlarının ELISA yöntemi ile araştırılması. *Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi.* Cilt:5, sayı :1, s.43-46. 1999.
43. Evanson D.J., Klatt M. J., Donlevy T.P. and Flowers R.S.: Agar-based 24-H method for presumptive identification of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, 54(5), 370-371. 1991.
44. Farber J.M., Peterkin P. I.: *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews.* Vol. 55, No. 3 476-511. 1991.
45. Garrity M.G., Boone D.R., Castenholz R.W.: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, ISBN 978-0-387-21609-6. 2001.
46. Glomski I.J., Gedde M.M., Tsang A.W., Swanson J.A., Portnoy D.A.: The *Listeria monocytogenes* hemolysin has an acidic pH optimum to compartmentalize activity and prevent damage to infected host cells. *The J. Cell Biol.* 156(6):1029-1038. 2002.

47. Goebel W., Kuhn M.: Bacterial replication in the host cell cytosol. *Curr. Opin. Microbiol.* 3:49-53. 2000.
48. Goodridge L., Abedon S. T.: Bacteriophage biocontrol and bioprocessing: application of phage therapy to industry. *SIM News (Society for Industrial Microbiology News)* 53:254-262. 2003.
49. Gray M.L., Killinger A.H.: *Listeria monocytogenes* and Listeric infections. *Bacteriology, Reviews* 30 2, 309--82. 1966.
50. Gutiérrez D., Martín-Platero A.M., Rodríguez A., Martínez-Bueno M., García P., Martínez B.: Typing of bacteriophages by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR to assess genetic diversity. *FEMS Microbiol Lett.*322(1):90-7. 2011.
51. Güven A.: Elazığ ilinde tüketime sunulan et ve bazı et ürünlerinde *Listeria* türlerinin araştırılması. Doktora tezi, Fırat Üniversitesi, Elazığ. 1994.
52. Hagens S., Loessner M.J.: Phages of *Listeria* offer novel tools for diagnostics and biocontrol. *Front. Microbiol.*,5;1-6. 2014.
53. Hasöksüz M., Ilgaz A.: Marmara Bölgesindeki sağlam koyunların kan serumlarında ELISA yöntemi ile *Listeria monocytogenes*'e karşı oluşan antikorların saptanması ve listeriosis üzerinde etiyolojik-epizootiolojik çalışmalar. *İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi*, 26:157-174. 2000.
54. Hearty S.: Production and application of monoclonal antibodies suitable for the specific detection of *Listeria Monocytogenes*, Dublin City University. School of Biotechnology. 2005.
55. Hodgson D.A.: Generalized transduction of serotype 1/2 and serotype 4b strains of *Listeria monocytogenes*. *Mol. Microbiol.* 35, 312–323.2000.
56. Holko I., Urbanova J., Kantikova M., Pastorova K. and Kmet V.: PCR detection of *Listeria monocytogenes* in milk and milk products and differentiation of suspect isolates. *Acta Vet. Brno*, 71, 125-131. 2002.
57. İkiz S.: Listeriozun laboratuvar tanısı. I. Ulusal Zoonoz Kongresi, Erzurum, S: 62-64. 2007.
58. Jasinska S.: Bacteriophages of lysogenic strains of *Listeria monocytogenes*. *Acta Microbiol Pol* 13:29-43. 1964.

59. Jones J.B., Jackson I.E., Balogh B., Obradovic A., Iriarte F.B., Momol, M.T.: Bacteriophages for plant disease control. Annual Review of Phytopathology, 45, 245-262. 2007.
60. Kathariou S.: *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. J. Food. Protect. 65(11):1811-1829. 2002.
61. Kennerman E., Erdoğan H. M., Şentürk S. ve Gölcü E.: Bursa Bölgesindeki koyunlarda Listeriosis'in ELISA ile serolojik tanısı. Veteriner Cerrahi Dergisi. 6(3-4), 22-25. 2000.
62. Kim J. W., Siletzky R. M., Kathariou S.: Host ranges of *Listeria*-specific bacteriophages from the turkey processing plant environment in the United States, Applied And Environmental Microbiology, 74 (21), 6623–6630. 2008.
63. Kim J. W.: Temperature - dependent phage resistance in *Listeria monocytogene* epidemic clone II strains. North Carolina State University, Food Science, Raleigh, North Carolina. 2008.
64. Kim J., Siletzky R.M., Kathariou S.: Host ranges of *Listeria*-specific bacteriophages from the turkey processing plant environment in the United States, Appl. Environ. Microbiol. vol. 74 no. 21 6623-6630. 2008.
65. Klara M., Posfay B., Ellen R.W.: Listeriosis, Seminars in Fetal & Neonatal Medicine 14; 228–233. 2009.
66. Klaus S., Krüger D., Meyer, J.: Bakterienviren. (Jena: Gustav Fischer Verlag), pp. 300. 1992.
67. Klumpp J., Loessner M.J.: *Listeria* phages genomes, evolution, and application, Bacteriophage 3:3. 2013.
68. Kozak J., Balmer T., Byrne R., Fisher K.: Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products, Food Control, Vol 7. No. 4/5, pp. 215-221. 1996.
69. Kuenne C., Billion A., Mraheil M.A., Strittmatter A., Daniel R., Goesmann A., Barbuddhe S., Hain T., Chakraborty T.: Reassessment of the *Listeria monocytogenes* pan-genome reveals dynamic integration hotspots and mobile genetic elements as major components of the accessory genome. BMC Genomics; 14 : 47. 2013.

70. Lang L.H.: FDA approves use of bacteriophages to be added to meat and poultry products. *Gastroenterology*, 131, 1370. 2006.
71. Lauer P., Chow M.Y., Loessner M.J., Portnoy D.A., Calendar R.: Construction, characterization, and use of two *Listeria monocytogenes* site - specific phage integration vectors. *J. Bacteriol.* 184, 4177–4186. 2002.
72. Loessner M.J., Busse M.: Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl Environ Microbiol* 56, 1912-1918. 1990.
73. Loessner M.J., Goepl S., Busse M.: Comparative inducibility of bacteriophage in naturally lysogenic and lysogenized strains of *Listeria* spp. By U.V. light and Mitomycin C. *Lett Appl Microbiol*; 12:196-9. 1991.
74. Loessner M.J., Inman R.B., Lauer P., Calendar R.: Complete nucleotide sequence, molecular analysis and genome structure of bacteriophage A118 of *Listeria monocytogenes*: implications for phage evolution. *Mol Microbiol* 35, 324-340. 2000.
75. Loessner M.J., Rees E.D.: *Listeria* Phages: basics and applications. In: Waldor MK, Fiedman DI, Adhya SL, eds. *Phages: their role in bacterial pathogenesis and biotechnology*. Washington: ASM Press, 362-79. 2005.
76. Loessner M.J.: Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages. *Appl Environ Microbiol* 57, 882-884. 1991.
77. Lorber B.: Listeriosis. *Clin. Infect. Dis.* 24:1-11. 1997.
78. Low J.L. ve Donachie W.A.: Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis., *The Veterinary Journal*, 153, 9-29. 1997.
79. McLauchlin J.: *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *Journal of Applied Bacteriology* 63, 1-11. 1987.
80. Miedzybrodzki R., Borysowski J., Weber-Dabrowska B., Fortuna W., Letkiewicz S., Chapter 3 - Clinical Aspects of Phage Therapy. In: Malgorzata L, Waclaw S, editors. *Advances in Virus Research: Academic Press*. pp. 73-121. 2012.

81. Murray E.G.D., Webb R.A., Swann M.B.R.: A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis, caused by a hitherto undescribed bacillus, *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). J. Pathol. Bacteriol. 29:407-439. 1926.
82. Nakai T., Park S.C.: Bacteriophage therapy of infectious diseases in aquaculture. Research in Microbiology, 153, 13-18. 2002.
83. North R.J., Conlan J.W.: Immunity to *Listeria monocytogenes*. Chem. Immunol. 70:1-20. 1998.
84. Orndorf P.E., Hamrick T.S., Smoak I.W., Havell E.A.: Host and bacterial factors in Listeriosis Pathogenesis. Vet. Microbiol 114:1-15. 2006.
85. Parihar V.S., Barbudhe S.B., Danielsson-Tham M.L., Tham W.: Isolation and characterization of *Listeria* species from tropical seafoods, Food Control 19; 566–569. 2008.
86. Picoux J. B.: Ovine listeriosis. Small Ruminant Research, 76, 12-20. 2008.
87. Pirisi A.: Phage therapy--advantages over antibiotics? Lancet 356:1418. 2000.
88. Portno D.A.: Innate immunity to a facultative intracellular bacterial pathogen. Cur. Opin. Immunol. 4:20-24. 1992.
89. Portnoy D.A., Auerbuch V., Glomski I.J.: The cell biology of *Listeria monocytogenes* infection: The intersection of bacterial pathogenesis and cell-mediated immunity. J. Cell Biol. 158(3):409-414. 2002.
90. Portnoy D.A., Chakraborty T., Goebel W., Cossart P.: Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. Infect. Immun. 60(4):1263-1267. 1992.
91. Pouillot F., Gabard J.: Efficacy of phage therapy in experimental sepsis and meningitis caused by O25b:H4-ST131 *E. coli* strain producing CTX-M-15, Bacteriophages and probiotics- Alternative to antibiotics congress, Tbilisi, Georgia. 2012.
92. Quinn P.J., Carter M.E., Markey B.K. and Carter G.R.: Clinical veterinary microbiology. Mosby Publishing. London. 43-55, 327-344Pp. 2004.

93. Rice T. B.: Use of bacteriophage filtrates in treatment of suppurative conditions: report of 300 cases. *Am. J. Med. Sci.* 179:345–360. 1930.
94. Rocourt J.: [Bacteriophages and bacteriocins of the genus *Listeria*]. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [A]* 261, 12-28. 1986.
95. Rocourt J., Boerlin P., Grimont F., Jacquet C., Piffaretti J.C.: Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi* with a revised description of *Listeria grayi*. *International Journal of Systematic Bacteriology* 42, 1,171-4. 1992.
96. Rocourt J., Weymeyer U., Stackebrandt E.: Transfer of *Listeria denitrificans* to a new genus, *Jonesia* gen. nov. as *Jonesia denitrificans* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37, 3, 266-70. 1987.
97. Salyers A.A., Whitt D.D.: *Listeria monocytogenes*. P. 182-189. in: *Bacterial pathogenesis: A molecular approach*. ASM Pres, Washington D.C. ABD. 2002.
98. Sauders B.D., Wiedmann M.: Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. In E. T. Ryser, & E. H. Marth (Eds.), *Listeria, listeriosis, and food safety* (pp. 21e53). New York: Marcel Dekker. 2007.
99. Schless R.A.: *Staphylococcus aureus* meningitis: treatment with specific bacteriophage. *Am. J. Dis. Child.* 44:813–822. 1932.
100. Seeliger H.P.R., Jones D. *Listeria*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (volume II). pp. 1235-45. eds P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. 1986.
101. Seeliger, H. P. R.: *Listeriosis*, 2nd edition. Basel: Karger. 1961.
102. Seeliger, H.P.R., Hohne, K.: Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Methods in Microbiology*, 13, 31-49. 1979.
103. Shaughnessy L.M., Swanson J.A.: The rol of the activated macrophage in clearing *Listeria monocytogenes* infection. *Front. Biosci.* 12:2683-2692. 2007.

104. Smith H.W., Huggins M.B.: Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: Its general superiority over antibiotics. J Gen Microbiol 128:307-18; PMID: 7042903. 1982.
105. Southwick F.S., Purich D.L.: Intracellular pathogenesis of Listeriosis. The New Engl. J. Med. 334(12):770-776. 1996.
106. Stebbins C.E.: Structural Insights into bacterial modulation of the host cytoskeleton. Curr. Opin Struc. Biol. 14:731-740. 2004.
107. Stout B. F.: Bacteriophage therapy. Texas State J. Med. 29:205–209. 1933.
108. Stuart S.E., Welshimer H.J.: Taxonomic reexamination of *Listeria* Pirie and transfer of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi*, to a new genus Murrava. International Journal of Systematic Bacteriology, 24, 177-85. 1974.
109. Sulakvelidze A., Alavidze Z., Morris J.G.: Bacteriophage therapy. Antimicrobial Agents And Chemototherapy, 45 (3), 649–659. 2001.
110. Summers W.C.: Felix d'Herelle and the origins of molecular biology. Yale University Press, New Haven, Conn 14. 1999.
111. Swaminathan B, Gerner-Smidt P.: The epidemiology of human listeriosis, Microbes and Infection 9; 1236-1243. 2007.
112. Şahin M., Türkiyede listeriyozun hayvanlardaki durumu, I. Ulusal Zoonoz Kongresi, Erzurum. 2007.
113. Şahin M. ve Beytut E.: Abortions in sheep due to *Listeria ivanovii* in the Kars region. Turk. J. Vet. Anim. Sci. 30, 503-506. 2006.
114. Vazquez-Boland J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty, T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., Gonzalez-Zorn B., Wehland J., Kreft J.: *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clin. Microbiol. Rev. 14(3): 584-640. 2001.
115. Vongkamjan K., Switt A.M., den Bakker H.C., Fortes E.D., Wiedmann M.: Silage collected from dairy farms harbors an abundance of listeriaphages with considerable host range and genome size diversity., Appl Environ Microbiol.78(24):8666-75. 2012.

116. Wang I.N., Smith D.L., Young R.: Holins: the protein clocks of bacteriophage infections. *Annu Rev Microbiol* 54, 799-825. 2000.
117. Warriner K., Namvar A.: What is the hysteria with *Listeria*?, *Trends in Food Science & Technology* 20; 245-254. 2009.
118. Wendlinger G., Loessner M.J., and Scherer S.: Bacteriophage receptors on *Listeria monocytogenes* cells are the N-acetylglucosamine and rhamnose substituents of teichoic acids or the peptidoglycan itself. *Microbiology* 142, 985-992. 1996.
119. Wilkinson B.J., Jones D.: A numerical taxonomic survey of *Listeria* and related bacteria. *Journal of General Microbiology*, 98, 399-421. 1977.
120. Yavuz M., Korukluoğlu M.: *Listeria monocytogenes*'in Gıdalardaki Önemi ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri, *U. Ü. Ziraat Fakültesi Dergisi*, Cilt 24, Sayı 1, 1-10. 2010.
121. Young I., Wang I., Roof W.D.: Phages will out: strategies of host cell lysis. *Trends Microbiol* 8, 120-128. 2000.
122. Zimmer M., Sattelberger E., Inman R.B., Calendar R., Loessner M.J.: Genome and proteome of *Listeria monocytogenes* phage PSA: an unusual case for programmed +1 translational frameshifting in structural protein synthesis. *Mol Microbiol* 50, 303-317. 2003.
123. Zink R., Loessner M.J., Scherer S.: Characterization of cryptic prophages (monocins) in *Listeria* and sequence analysis of a holin/endolysin gene. *Microbiology* 141, 2577-2584. 1995.
124. Zink R., Loessner M.J.: Classification of virulent and temperate bacteriophages of *Listeria* spp. on the basis of morphology and protein analysis. *Appl Environ Microbiol* 58, 296-302. 1992.

8. ÖZGEÇMİŞ

Ankara'nın Beypazarı ilçesinde 1981 yılında doğdum. İlköğrenimi ve lise öğrenimimi Beypazarı'nda tamamladım. Gazi Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nden 2005 yılında mezun oldum. Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü'nde 2008'de Araştırma Görevlisi olarak göreve başladım. Kafkas Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümü Genel Biyoloji Anabilim Dalında 2009 yılında yüksek lisansımı tamamladım. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'nda 2010 yılında doktora başladım. Halen Biyoloji Bölümü'nde Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktayım.